

GIOVANI PISA

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO SOLO ADERIDO À RAIZ DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

CURITIBA  
2010

GIOVANI PISA

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO SOLO ADERIDO À RAIZ DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como Requisito Parcial à Obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Leonardo Magalhães Cruz  
Co-orientador: Prof. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA  
2010

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Pisa, Giovani

Diversidade de bactérias do solo aderido à raiz de cana-de-açúcar. /  
Giovani Pisa. – Curitiba, 2010.  
143 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Leonardo Magalhães Cruz

Co-orientador: Emanuel Maltempi de Souza

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Bacterias 2. Cana-de-açúcar - Solos I. Título II. Cruz, Leonardo  
Magalhães. III. Souza, Emanuel Maltempi IV. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.9

## TERMO DE APROVAÇÃO

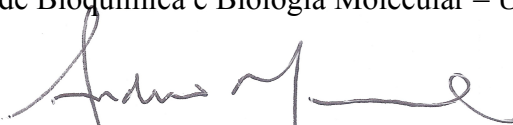
GIOVANI PISA

### **DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO SOLO ADERIDO À RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR**

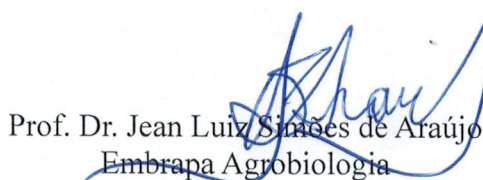
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Co-orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



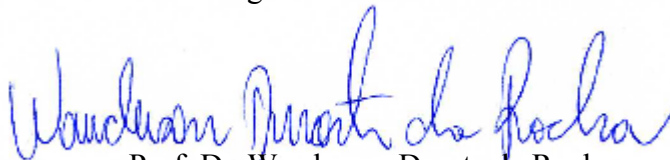
Prof. Dr. Andrew Maraie  
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes – UFRJ



Prof. Dr. Jean Luiz Simões de Araújo  
Embrapa Agrobiologia



Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira  
Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária – PUCPR



Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 13 de dezembro de 2010

Dedico esta tese à  
minha esposa Fabiana  
pelo apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, aos professores Miguel Nosedá e Silvia Cadena

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

Ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa, pela oportunidade de desenvolver minhas atividades no laboratório de Biologia Molecular .

Aos meus orientadores professores Emanuel Maltempi de Souza e Leonardo Magalhães Cruz pela análise e discussão de todo o trabalho.

Aos pesquisadores do Departamento de Fitotecnia do Setor de Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Prof. João Carlos Bessalho, Prof. Edeuclaiton Davos, e Dr. Heroldo Weber.

Às Funcionárias Irene Luzia Forghieri Rosa, Julieta Pie e Roseli Prado.

Ao meu caro amigo Marco Antônio Kadowaki pelo apoio e incentivo.

Ao Arnaldo Glogauer, que com duas ou três dicas de melhores práticas laboratoriais, permitiu a conclusão dos experimentos.

Os lábios da sabedoria estão  
fechados, exceto aos ouvidos do  
entendimento.

O Caibalion.

## RESUMO

A cana-de-açúcar é um importante produto agrícola no Brasil, com uma produção de mais de 500 milhões de toneladas ao ano. A cana-de-açúcar é alvo de intensas pesquisas no campo da diversidade bacteriana. O conhecimento das bactérias integrantes das comunidades associadas com culturas agrícolas e da situação do solo é um passo decisivo para compreender como microrganismos influenciam a produção. No entanto, a maioria destes estudos visam isolar bactérias endofíticas ou bactérias rizosféricas associadas à planta em uma abordagem dependente de cultivo. Atualmente, as abordagens independentes de cultivo permitem uma visão mais abrangente de toda a comunidade de bactérias no ambiente estudado. No presente trabalho, utilizou-se uma abordagem independente de cultivo para a avaliação da comunidade bacteriana associada ao solo rizosférico sob cultivo de cana em diferentes tempos de coleta e de adubação nitrogenada. Em níveis taxonômicos mais elevados, diferenças significativas entre as amostras não foram observadas, predominando os filos Proteobactérias (29,5%), Acidobacteria (23,4%), Bacteroidetes (12,2%), e Firmicutes (10,2%). No entanto, em níveis taxonômicos mais baixos, uma diversidade maior foi encontrado associado à administração de fertilizantes nitrogenados. *Bacillus* foi o gênero predominante, respondendo por 19,7% de todos os gêneros observados. Gêneros classicamente descritos, contendo fixadoras de nitrogênio ou promotoras de crescimento das plantas também foram encontradas, com representantes dos gêneros *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, e *Burkholderia*.

**Palavras-chave:** cana-de-açúcar, rizosfera, bactéria, diversidade.



## ABSTRACT

Sugarcane crop is an important agricultural product in Brazil, with a production of more than 500 Mi tons and is subject of intense research in the field of bacterial diversity. The knowledge about the bacterial community associated with agricultural crops and the soil is a decisive condition to understand how microorganisms influence the production. However, most of these studies aim to isolate endophytic or rhizospheric bacteria associated to the plant in a culture dependent approach. Nowadays, culture independent approach allow a wide view of the bacterial communities in the environment. In the present work, we have used such an approach to access the bacterial community associated to rhizosphere soil under sugarcane crop field, in different time and under different treatments of nitrogen fertilization. At high taxonomic level, significant difference among samples was not observed, predominating the phyla Proteobacteria (29.5%), Acidobacteria (23.4%), Bacteroidetes (12.2%), and Firmicutes (10.2%). However, in a low taxonomic level a higher diversity was found associated to plant receiving nitrogen. *Bacillus* was the predominant genus found, accounting for 19.7% of all observed genera. Genera classically reported containing nitrogen-fixing and/or plant growth promoting bacteria species were also found with minor representatives, such as *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Burkholderia*.

Key words: sugarcane, rhizosphere, bacteria, diversity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ÁRVORE FILOGENÉTICA UNIVERSAL..	22
FIGURA 2. FLUXOGRAMA PARA ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS A PARTIR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS COM BASE EM FILOGENIA (SETAS PRETAS) E SUA INTERAÇÃO COM OUTRAS TÉCNICAS MOLECULARES (SETAS CINZAS).....	27
FIGURA 3: REGIÕES HIPERVARIÁVEIS NO 16S RRNA DE BACTÉRIAS.....	30
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DAS REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO GENE 16S RRNA.....	31
FIGURA 5: CICLO DO NITROGÊNIO.....	38
FIGURA 6. PADRÕES DE ARDRA PARA AMOSTRAS DE SOLO ADERIDO À RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR. ....	70
FIGURA 7. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO A PARTIR DOS RESULTADOS DE ARDRA PARA AS AMOSTRAS DE SOLO ADERIDO À RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR. ....	71
FIGURA 8. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO A PARTIR DOS RESULTADOS DE RFLP DO GENE NIFH PARA 5 AMOSTRAS DE SOLO ADERIDO À RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR. ....	72
FIGURA 9. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO A PARTIR DOS RESULTADOS DE RFLP DO GENE NIRK PARA 5 AMOSTRAS DE SOLO ADERIDO À RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR. ....	73
FIGURA 10. DISTRIBUIÇÃO DOS COMPRIMENTOS DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RRNA PARA AS BIBLIOTECAS CONTROLE, FERT E NAOFERT.....	77
FIGURA 11. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS BIBLIOTECAS DE 16S RDNA COM COMPRIMENTO $\geq$ 250 PB, MOSTRANDO A REGIÃO COBERTA EM RELAÇÃO A SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S RRNA DE E. COLI.....	78
FIGURA 12. DISTRIBUIÇÃO DOS FILOS PREDOMINANTES PARA AS BIBLIOTECAS DO GENE 16S RRNA DE AMOSTRAS DE SOLO ADERIDO A RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	81
FIGURA 13. DISTRIBUIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DO CONJUNTO DAS AMOSTRAS CONTROLE, FERT E NAOFERT NO FILO PROTEOBACTERIA.....	82

FIGURA 14. CURVA DE RAREFAÇÃO PARA O CONJUNTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE 16S RRNA DAS AMOSTRAS CONTROLE, FERT E NAOFERT A 3% E 20% DE DISSIMILARIDADE.....	94
FIGURA 15. ESTIMADORES DE RIQUEZA DE OTU POR BIBLIOTECA.....	103
FIGURA 16. DIAGRAMA DE VENN (ESQUERDA) E HEATMAP (DIREITA) MOSTRANDO O COMPARTILHAMENTO DE OTU PARA AS COMUNIDADES BACTERIANAS DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	105

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FERRAMENTAS USADAS EM ECOLOGIA MICROBIANA PARA DESCREVER E COMPARAR COMUNIDADES MICROBIANAS1.....	47
TABELA 2. BANCOS DE DADOS ESPECIALIZADOS EM RNA RIBOSSOMAIS. .....	50
TABELA 3. IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	65
TABELA 4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DO SOLO ADERIDO ÀS RAÍZES DAS AMOSTRAS DE PLANTAS DE CANA-DE- AÇÚCAR1.....	66
TABELA 5. NÚMERO DE CLONES DO GENE 16S RRNA SEQUENCIADOS EM CADA UMA DAS BIBLIOTECAS.....	76
TABELA 6. IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS TAXONÔMICOS NO CLASSIFIER RDP II PARA O CONJUNTO DAS SEQUÊNCIAS DAS AMOSTRAS CONTROLE, FERT E NAOFERT.....	86
TABELA 7. IDENTIFICAÇÃO ATÉ GÊNERO PARA CLONES DAS BIBLIOTECAS DO GENE 16S RRNA DE AMOSTRAS DE SOLO ADERIDO À RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	87
TABELA 8. RESULTADOS PARA BUSCA COM O PROGRAMA MEGA-BLAST PARA CLONES IDENTIFICADOS COMO BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS/ASSOCIATIVAS.....	89
TABELA 9. MEDIDAS E ESTIMATIVAS DA RIQUEZA, DIVERSIDADE E NÚMERO ADICIONAL DE OTU PARA AS AMOSTRAS INDIVIDUAIS1.....	100
TABELA 10. MEDIDAS E ESTIMATIVAS DA RIQUEZA E SIMILARIDADE COMPARTILHADAS ENTRE OS PARES DE AMOSTRAS1.....	101
TABELA 11. RESULTADOS PARA OS TESTES DE SIGNIFICÂNCIA PARA A COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS AOS PARES NAS ANÁLISES DE TESTE DE HIPÓTESE.....	110

## LISTA DE SIGLAS

- 16S rDNA DNA ribossomal de 16S
- 16S rRNA RNA ribossomal de 16S
- 23S rRNA RNA ribossomal de 23S
- ACE Estimador de Cobertura Baseado em Abundância (do inglês, *Abundance Based Coverage Estimator*)
- ARDRA Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (do inglês, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)
- Cu Cobre
- DGGE Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (do inglês, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* )
- DNA ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxirribonucleic acid*)
- FISH Hibridização Fluorescente *In Situ* (do inglês, *Fluorescence In Situ Hybridization* )
- kb kilo bases
- OTU Unidade Taxonômica Operacional (do inglês, *Operational Taxonomic Unit*)
- pb pares de bases
- PCR Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)
- PGPR Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (do inglês, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*)
- qPCR PCR quantitativo (do inglês, *quantitative PCR*)
- RFLP Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
- RNA ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)
- SSCP Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (do inglês, *Single Strand Conformation Polymorphism* )
- TGGE Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (do inglês, *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)
- tRF Fragmento de Restrição Terminal (do inglês, *Terminal Restriction Fragment*)
- UPGMA Método de Agrupamento por Pares Não Ponderados Com Média Aritimética (do inglês, *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* )

## SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	15
1.2 O Solo e a atividade microbiana.....	15
1.3 Diversidade bacteriana.....	16
1.3.1 Diversidade de bactérias da rizosfera.....	18
1.3.2 Bactérias endofíticas de cana-de-açúcar.....	20
1.4 Estudo da diversidade através de métodos moleculares.....	20
1.4.1 Técnicas para análise da diversidade de microrganismos em amostras ambientais.....	23
1.4.2 Genes utilizados para análise em sistemática bacteriana e diversidade.....	28
1.4.3 Utilização do gene 16S rRNA na identificação de bactérias.....	32
1.4.4 Tendências na análise de diversidade baseada em bibliotecas do gene 16S rRNA.....	34
1.4.5 Genes funcionais do metabolismo de nitrogênio para avaliação da diversidade de grupos específicos.....	37
1.4.6 Índices e estimadores da Diversidade Bacteriana.....	39
1.4.7 Ferramentas computacionais para análise da diversidade a partir de dados de sequências de DNA.....	42
2 OBJETIVO.....	51
3 JUSTIFICATIVA.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Delineamento experimental e amostragem.....	53
4.2 Tratamento das amostras no laboratório.....	53
4.3 Extração de DNA das bactérias do solo.....	54
4.4 Amplificação dos genes de 16S rDNA, nifH e nirK.....	54
4.5 Purificação dos produtos de amplificação por PCR.....	55
4.6 Análises de ARDRA.....	56

4.7 Análise de RFLP dos genes nifH e nirK.....	56
4.8 Análise de agrupamento para os experimentos de ARDRA e RFLP .....	57
4.9 Construção das Bibliotecas dos Genes.....	57
4.10 Transformação bacteriana.....	58
4.11 Preparação dos plasmídeos para sequenciamento.....	58
4.12 Sequenciamento das bibliotecas do gene 16S rRNA.....	60
4.13 Análise das sequências.....	60
5 Resultados e Discussão.....	64
5.1 Amostragem das plantas e análise do solo.....	64
5.2 Análise de ARDRA e RFLP dos genes nifH e nirK.....	67
5.3 Construção, sequenciamento e análise dos clones das bibliotecas do gene 16S rRNA.....	74
5.3.1 Análise baseada na identificação taxonômica dos clones.....	79
5.3.2 Análise baseada em OTU.....	92
5.3.3 Análise baseada em testes de hipótese.....	106
6 Conclusões.....	111
Referências bibliográficas.....	114
Anexos.....	127

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi a primeira cultura agrícola trazida ao Brasil. É cultivada a mais de quatrocentos anos na região litorânea do Nordeste do país. Esta cultura tem se disseminado por todos os estados brasileiros, pela demanda por álcool etílico, tendo se estabelecido em vários tipos de solo (EMBRAPA - Impacto Ambiental da Cana-de-açúcar, 2006). Entre as gramíneas, a cana-de-açúcar se destaca por dois aspectos: alta produção de matéria seca (MS) por hectare e capacidade de manutenção do potencial energético durante o período seco, além disso, o seu replantio se faz necessário apenas a cada quatro ou cinco anos, sendo desta maneira considerada uma alternativa de alimento para a seca (EMBRAPA - Cana-de-açúcar: uma alternativa de alimento para a seca, 2002). No ano de 2005 o Brasil foi o maior produtor de cana-de-açúcar, superando os 560 milhões de toneladas produzidas, produção avaliada em aproximadamente oito bilhões de dólares, somando-se as exportações de álcool e açúcar (MAPA, 2009).

### 1.2 O Solo e a atividade microbiana

A atividade microbiana é o que distingue o solo de outras formações geológicas (VARGAS e HUNGRIA, 1997). O solo apresenta propriedades que determinam a sua comunidade microbiana e a sua funcionalidade. Estas propriedades incluem aspectos geográficos, geológicos, hidrológicos, climáticos, faunístico, florístico e influências antropogênicas (LIESACK et al 1997).

Um sistema adequado solo-rizosfera é a condição básica para assegurar produção e qualidade de determinada cultura. Para se manter boas condições de crescimento, muitos esforços têm sido feitos por parte de especialistas em solo, microbiologistas e outros profissionais a fim de se estabelecer tecnologias que permitam monitorar e identificar a condição ótima do sistema solo-rizosfera, bem como o uso adequado de fertilizantes. Para que



estas técnicas possam ser aplicadas, é necessário que se disponha de informações e desenvolver estratégias para assegurar a fertilidade do solo, uso racional de fertilizantes nitrogenados, população equilibrada de micro-organismos e qualidade da cultura no sistema solo-rizosfera (FFTC - Food and Fertilizer Technology center, 2006). Muitas espécies de bactérias têm potencial para propósitos ambientais e comerciais (agricultura). Entre estes propósitos estão: controle biológico, biorremediação, fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento de plantas. A habilidade dos micro-organismos em colonizar a rizosfera de plantas como arroz, trigo e cana-de-açúcar em alta densidade populacional deve expandir o potencial de aplicação destes micro-organismos (SALLES et al., 2004). Entre as muitas funções essenciais desempenhadas pela biota do solo é possível destacar a decomposição da matéria orgânica, imobilização de nutrientes, solubilização de nutrientes, reações de oxidação-redução e fixação biológica de nitrogênio (MOTAVALLI, et al., 2004).

Práticas agronômicas tais como rotação de culturas, plantio direto e convencional são capazes de alterar comunidades de micro-organismos, sendo que estas mudanças podem persistir muito tempo depois de abandonadas estas práticas (SALLES et al., 2004). As atividades humanas estão afetando negativamente a biodiversidade tanto na composição como no número de espécies nos ecossistemas, deste modo o funcionamento normal dos ecossistemas está sendo alterado. A redução na biodiversidade de micro-organismos do solo pode ser explicada, ao menos em parte, pela reduzida oferta de exsudato das raízes de plantas, consequência da substituição de um sistema florestal por uma monocultura, pois a maior parte das bactérias do solo são heterotróficas e capazes de utilizar estes compostos como alimento, (LORANGER-MERCIRIS et al., 2006).

### 1.3 Diversidade bacteriana

A complexidade e riqueza de espécies em uma amostra ambiental é enorme. As estimativas para o número de espécies de bactérias por grama de solo são bastante variáveis, ficando entre 2.000 e 8,3 milhões (GANS et al.,

2005; SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006a; RÖSCH, 2007). Por outro lado, alguns habitats podem abrigar uma maior diversidade, sendo conhecidos como *hot spots*. Por exemplo, hibridização usando sonda de DNA e análise de dot-blot sugere que a abundância de bactérias é maior próximo das raízes em relação ao solo somente (RÖSCH et al., 2005). Influências em grupos funcionais de organismos também são observadas. A concentração de bactérias desnitrificantes parece também ser maior na superfície da raiz quando comparada ao solo nu. Além da grande diversidade contida em ambientes como o solo, outro problema para a análise da diversidade é dada pelas estimativas para o número de bactérias não cultivadas (AMANN et al., 1995), que variam de cerca de 0,1% a 15%, dependendo do habitat e outros fatores (RÖSCH et al., 2005; CONN et al., 1918).

Da maneira mais simples o termo biodiversidade é usado para se referir apenas ao número de espécies presentes em uma determinada amostra ou à “riqueza de espécies”. Entretanto, algumas medidas de diversidade incluem não apenas o aspecto variedade, como também uma medida de abundância relativa (BARROS, 2009; MARTINS & SANTOS, 2009). De acordo com a escala utilizada pode-se distinguir três tipos de diversidade (BARROS, 2009): a) diversidade alfa – ou local, corresponde à diversidade dentro de um habitat ou comunidade; b) diversidade beta – corresponde à diversidade entre habitats ou outra variação ambiental qualquer, isto é, mede o quanto a composição de espécies varia de um lugar para outro; c) diversidade gama – ou regional, corresponde à diversidade de uma grande área, bioma, continente, ilha, etc.

A descoberta de novos organismos e a caracterização das suas funções são os principais objetivos no estudo da diversidade de microrganismos. Historicamente, este problema foi abordado através do cultivo e subsequente caracterização de estirpes. Algumas décadas depois, métodos independentes de cultivo estão fornecendo novas ferramentas para o estudo da diversidade. Recentemente, a metagenômica está fornecendo uma alternativa para exploração baseada em genes da comunidade como um todo, enquanto o isolamento e cultivo continua como a principal abordagem para testar

capacidades metabólicas e estudos genômicos mais detalhados de membros individuais da comunidade (CARDENAS & TIEDJE, 2008).

### 1.3.1 Diversidade de bactérias da rizosfera

A rizosfera, uma região descrita como a parte do solo com maior contato com a raiz, possui uma grande concentração de microrganismos, responsáveis por processos de decomposição, mineralização, fixação de nitrogênio, desnitrificação, armazenamento e mobilização de nutrientes. Um destes processos merece destaque: a solubilização de fosfato, no qual fosfato insolúvel é convertido em formas solúveis nos solos, tornando-o disponível para as plantas (KANG et al., 2002; PRADHAN; SUKLA, 2006; KHAN, ZAIDI e WANI, 2007). A rizosfera tem sido o foco de intensa pesquisa pela sua importância na nutrição e patogênese das plantas. A rizosfera é uma microzona na interface raiz-solo que está sob influência da raiz da planta, e pode variar de 2-80 mm, dependendo da espécie da planta. Muitos processos de interação física, química e biológica acontecem nesta região. A rizosfera distingue-se das regiões do solo pela atividade microbiana aumentada. O uso de plantas na recuperação de solos degradados (chamada fitorremediação) tem atraído interesse comercial e em pesquisas. A atividade aumentada de microrganismos, encontrada na rizosfera, tem importância fundamental em relação à biodisponibilidade e mobilidade de íons nutrientes, metais inorgânicos e contaminantes orgânicos (AEHS – The Association for Environmental Health and Sciences, 2007).

As raízes das plantas desempenham importante papel na composição de comunidades microbianas no solo por liberarem uma grande quantidade de compostos, porém a composição e a qualidade destes compostos variam de acordo com a espécie da planta, o tipo de solo e o estágio de crescimento (WIELAND et al., 2001). Compõe os exsudatos das raízes mais de 100.000 compostos de baixo peso molecular (HARRISON e DIXON, 1993). Estes compostos apresentam diferentes configurações em termos de composição quanto ao tipo de planta, estado fisiológico no qual esta planta encontra-se, de uma mesma espécie e até mesmo entre cultivares

(WHIPPS, 2001; RENGEL, 2002; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004). As bactérias da rizosfera utilizam esses exsudados como nutrientes, portanto as diferenças em substratos das raízes podem explicar as diferenças que existem na composição da comunidade bacteriana que é específica para diferentes espécies de plantas cultivadas sob condições semelhantes (MARSCHNER, CROWLEY; LIEBEREI, 2001; KOWALCHUK; DE SOUZA; VAN VEEN, 2002; SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Além disso, as características do solo também são determinantes da comunidade rizosférica, como pH, disponibilidade de nutrientes e retenção de umidade (YANG e CROWLEY, 2000; HERTENBERGERZ et al., 2002). Tipos diferentes de solo de rizosfera possuem diferentes comunidades bacterianas independentemente da espécie de planta cultivada (SALLES et al., 2004; COSTA et al., 2006).

A rizosfera tem sido alvo de muitos estudos sobre a diversidade microbiana porque é um ambiente altamente favorável para o desenvolvimento de microrganismos que interagem diretamente com o solo e com as raízes das plantas. O “efeito rizosfera”, de atividade bacteriana aumentada próximo às raízes, já tinha sido observado mais de 100 anos atrás, em 1904, por Lorenz Hiltner. Conhecer a composição de comunidade bacteriana da rizosfera é importante uma vez que as interações estabelecidas entre as plantas e estes micro-organismos podem ser interações positivas ou negativas (BUCHENAUER, 1998; ATKINSON e WATSON, 2000; SYLVIA e CHELLEMI, 2001).

O grupo de bactérias chamado de Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal, PGPR (do inglês, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), vem sendo bastante estudado (KLOEPPER; SCHROTH, 1978; VESSEY, 2003). A produção de fitorreguladores como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno e a disponibilização de nutrientes, como por exemplo, a fixação biológica do nitrogênio ou a solubilização de fosfatos, e principalmente a solubilização de fosfato são responsáveis pelo crescimento vegetal (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; RICHARDSON, 2001) promovido por este grupo de bactérias.

### 1.3.2 Bactérias endofíticas de cana-de-açúcar

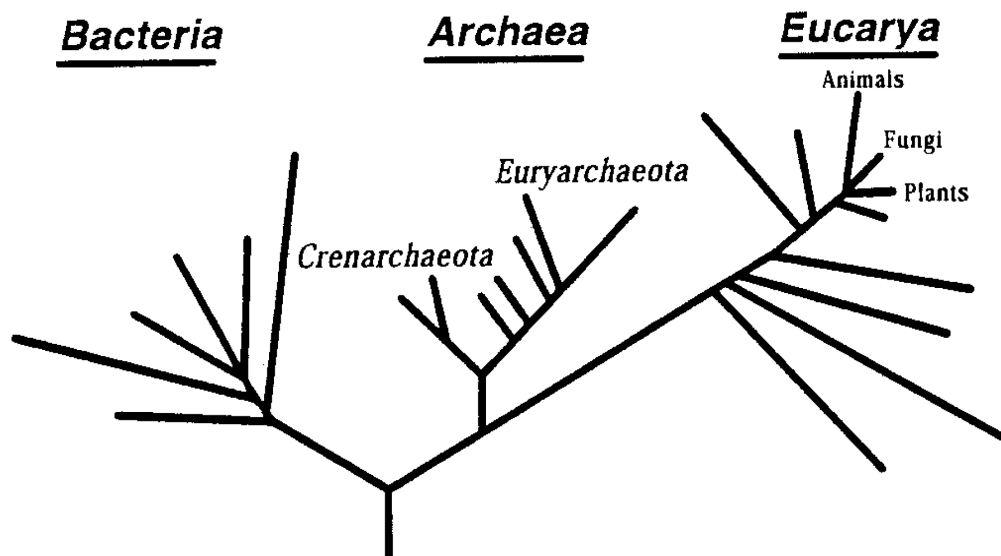
A maior parte dos dados sobre bactérias em associação com plantas de cana-de-açúcar que estão disponíveis provém de estudos de interação destas plantas com endófitos, particularmente bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (diazotróficas). *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma destas bactérias endofíticas (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999), inicialmente isolada da cana-de-açúcar. Outros exemplos de endofíticos diazotróficos associados à cana-de-açúcar são: *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii* e *Paenibacillus polymyxa* (RUSCHEL, 1981; CAVALCANTE E DÖBEREINER, 1988; OLIVARES et al., 1996). Embora o estudo de bactérias associadas à cana-de-açúcar esteja fortemente ligado às bactérias fixadoras de nitrogênio (MAGNANI, 2009), alguns trabalhos indicam que as bactérias endofíticas diazotróficas constituem uma pequena fração de toda a comunidade de bactérias endofíticas (MAGNANI et al., 2010; MAGNANI, 2009; SUMAN, 2001). Grande parte destas bactérias endofíticas podem beneficiar a planta e promover seu crescimento e é importante saber se o solo representa um repositório para estes organismos e que fatores poderiam influenciá-los.

### 1.4 Estudo da diversidade através de métodos moleculares

Animais e plantas são suficientemente complexos morfológicamente para que seja possível estabelecer uma filogenia com base nestas características. Em contraste, a morfologia e fisiologia das bactérias e muitas outras propriedades não são informativas o suficiente para serem utilizadas como marcadores filogenéticos e geralmente acabam agrupando organismos que são essencialmente diferentes (PACE, 1997).

Em laboratório suspensões de células diluídas serialmente e plaqueadas em meio sólido de agar para obter colônias isoladas são usadas para a realização de testes bioquímicos e fenotípicos com o objetivo de identificar espécies de bactérias. Estas características não são capazes de informar relações evolutivas entre bactérias, sendo que estas relações são a

base para um sistema de classificação bacteriana mais precisa. O tamanho microscópico dos micro-organismos e, em muitos casos, a dependência de hospedeiros e substratos específicos para sua sobrevivência e multiplicação também são importantes limitações dos métodos de cultivo tradicionais (TORSVIK & ØVREÅS, 2002; PROSSER, 2002; HUNGENHOTLZ & PACE, 1996). Há uma dificuldade inerente na avaliação da real diversidade de bactérias em amostras de ambientes como o solo, pois apenas uma pequena fração destes organismos é atualmente cultivável em meios artificiais e incapaz de representar a comunidade bacteriana total (JENSEN, 1968). A utilização de métodos moleculares na sistemática e evolução, não só a base para a divisão dos organismos vivos em três domínios, hoje largamente aceita: eucariotos, bactérias e arqueias (FIGURA 1) (WOESE, 1987; WOESE, 2000), como também permitiu um grande avanço na microbiologia através de estudos da diversidade de microrganismos sem a necessidade de cultivo. Os métodos independentes de cultivo foram enormemente favorecidos pela aplicação de métodos moleculares, principalmente aqueles em que se utilizam genes amplificados por PCR (JANSSEN, 2006). Métodos independentes de cultivo que envolvem a extração de DNA total da comunidade bacteriana em questão e caracterização de bibliotecas do gene 16S rRNA (16S rDNA) estão permitindo a avaliação da composição de comunidades bacterianas *in situ* sem a necessidade de isolar essas comunidades em cultura (AISLABIE et al., 2006).



*FIGURA 1: Árvore Filogenética Universal. Construída a partir de análise comparativa de sequências do gene 16S rRNA (WOESE, 2000).*

#### 1.4.1 Técnicas para análise da diversidade de microrganismos em amostras ambientais

Um fluxograma de análise da diversidade de comunidades de microrganismos a partir de amostras ambientais com algumas das técnicas mais comumente empregadas é apresentado na FIGURA 2. Dentre os diferentes métodos empregados aqueles baseados na extração de DNA seguida de amplificação por PCR (RÖSCH et al., 2005) são, atualmente, os mais utilizados. A PCR permite a amplificação seletiva de regiões do DNA a partir de pequenas quantidades de DNA extraído de amostras ambientais e é geralmente usado como o primeiro passo na análise filogenética de comunidades microbianas e para várias outras abordagens moleculares de estudos ecológicos (RÖLING & HEAD, 2005). Uma breve descrição das técnicas mais largamente empregadas é dada a seguir, destacando algumas das principais vantagens e desvantagens de cada uma.

*Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) – neste método, uma sonda para um gene alvo é marcada por fluorescência. Hibridização *in situ* com a sonda marcada em combinação com microscopia laser confocal permite a enumeração do número de organismos específicos em uma amostra. O método fornece dados relativos a correlação entre fisiologia e abundância de um ou um grupo de organismo(s), mas dificilmente fornece informação a respeito da estrutura da comunidade (RÖSCH et al., 2005).

*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis/Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE/TGGE) – nesta técnica, fragmentos amplificados de genes alvo são separados por eletroforese empregando um gradiente desnaturante químico ou por temperatura, permitindo estimar a abundância relativa dos organismos dominantes na amostra através do número, posição e intensidade das bandas no gel. Frequentemente são obtidos padrões complexos e organismos minoritários pode não ser representados. Como em outros métodos, a técnica fornece uma indicação apenas do grau de diversidade na comunidade de microrganismos. Interessantemente, a técnica permite o isolamento de bandas do gel para posterior clonagem e



sequenciamento, identificando grupos específicos de organismos presentes na amostra (RÖSCH et al., 2005).

quantitative PCR (qPCR) – permite quantificar a concentração de um gene em uma amostra de DNA ambiental através da PCR em tempo real. O conteúdo relativo de um gene pode ser comparado em diferentes amostras de DNA. A técnica é laboriosa e a quantificação absoluta requer calibrações cuidadosas e preparação de amostras de DNA com alta pureza. Além disso, o produto de amplificação por PCR precisa ser relativamente curto (<150 pb) e amplificação de produtos inespecíficos deve ser cuidadosamente avaliada (RÖSCH et al., 2005).

*terminal Restriction Fragment* (tRF) – nesta técnica, o gene alvo em uma amostra de DNA extraído do ambiente é amplificado por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores universais. Um dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação é marcado na ponta 5' com um marcador fluorescente. O DNA amplificado é digerido com uma enzima de restrição e o material digerido é separado em um sequenciando de DNA automático. Os comprimentos do tRF em pares de base precisam ser determinados a partir de um padrão de tamanho de DNA. Os padrões de tRF podem ser usados para determinar a abundância relativa dos amplificados em uma mistura e para detectar mudanças na diversidade funcional das comunidades de microrganismos. A técnica não permite isolamento de um tRF para clonagem, sequenciamento e identificação dos organismos envolvidos. A técnica emprega uma única enzima de restrição e vários organismos não relacionados podem gerar um tRF com o mesmo tamanho, sendo fonte de ambiguidade (RÖSCH et al., 2005).

*Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) – a técnica se baseia na separação eletroforética de acordo com diferenças nas sequências de uma determinada região do DNA (por ex., 16S rDNA). DNA simples fita é separado em um gel de poliacrilamida baseado em diferenças na mobilidade causada por sua estrutura secundária. Possui as mesmas limitações do DGGE. Além disso, alguns DNA simples fita podem formar mais de uma conformação estável e uma sequência pode ser representada por mais de uma banda no

gel. Por outro lado, não requer um grampo GC ou a construção de géis em gradientes (KIRK et al., 2004).

*Restriction Fragment Length Polymorphism/Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (RFLP/ARDRA) – esta técnica também se baseia no polimorfismo do DNA. Fragmentos com comprimentos diferentes são detectados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida não desnaturante após digerir os fragmentos amplificados por PCR com enzimas de restrição que reconhecem 4 bases. Pode ser usado para varredura de clones ou como uma medida da estrutura da comunidade (PACE, 1996). É útil para detectar mudanças estruturais na comunidade microbiana, mas não como uma medida da diversidade (LIU et al., 1997). Os padrões de bandejamento no gel podem se tornar muito complexos, uma vez que uma única espécie pode gerar de quatro a seis fragmentos de restrição (TIEDJE et al., 1999; KIRK et al., 2004).

Sequenciamento de DNA – é o procedimento mais confiável e preciso para identificação da maioria do microrganismos (STURSA et al., 2009). Inicialmente o método de Sanger para sequenciamento de DNA (SANGER et al., 1977) foi empregado nas análises de diversidade de microrganismos a partir de amostras ambientais. Tem a vantagem de gerar leituras de sequências longas, que podem chegar a 1.000pb. Entretanto, esta técnica necessita de uma etapa de clonagem dos fragmentos amplificados, tornando-se laboriosa e demorada. Novas tecnologias de sequenciamento de DNA por síntese (conhecidas coletivamente como de “nova geração” ou “segunda geração”) fornecem uma maneira mais barata e simples de sequenciamento, não exigindo etapa de clonagem. (CARDENAS & TIEDJE, 2008). Entretanto, uma desvantagem destas técnicas está no menor comprimento das leituras de sequências geradas. Esta deficiência é, em parte, compensada pela massiva quantidade de dados, velocidade e simplicidade. As novas metodologias criaram uma situação onde a limitação não é a capacidade de produzir dados de sequências de DNA mas a capacidade de armazená-los e analisá-los (CARDENAS & TIEDJE, 2008). Além disso, o sequenciamento de molécula de DNA única é uma técnica que está em amplo desenvolvimento e promete

avançar ainda mais diversas áreas, entre elas a microbiologia e a análise da diversidade. Entretanto, mesmo com a alta capacidade de produção as novas metodologias de sequenciamento de DNA parecem não ser suficientes para recuperar toda a diversidade microbiana presente em um amostra ambiental, como reportado por diversos autores. A análise da comunidade microbiana em mar profundo, próximo a fontes termais, mostrou que as 750.000 leituras de sequências de DNA produzidas foram insuficientes para determinar toda a diversidade da comunidade (HUBER et al., 2007). Entretanto, esta é uma questão controversa e ainda em discussão. RÖSCH e colaboradores (2007) demonstraram que para diferentes solos, usando sequências de 16S rDNA geradas por pirosequenciamento, o número máximo de sequências únicas nunca excedeu 52.000. Dentre as tecnologias de sequenciamento de DNA de nova geração, destaque é dado para o método de pirosequenciamento na análise da diversidade, principalmente devido ao comprimento da leitura que, atualmente pode chegar a 400-500pb.

Microarranjos de DNA (*Microarrays*)– o estudo da estrutura e função da diversidade de comunidades microbianas tem se beneficiado do uso de microarranjos que faz uso de marcadores filogenéticos e genes funcionais. Os arranjos fornecem alta produção, especificidade e relativa quantificação e não requer etapa de clonagem. Arranjos filogenéticos podem facilmente detectar mais diversidade microbiana do que as bibliotecas de clones tradicionais (CARDENAS & TIEDJE, 2008).

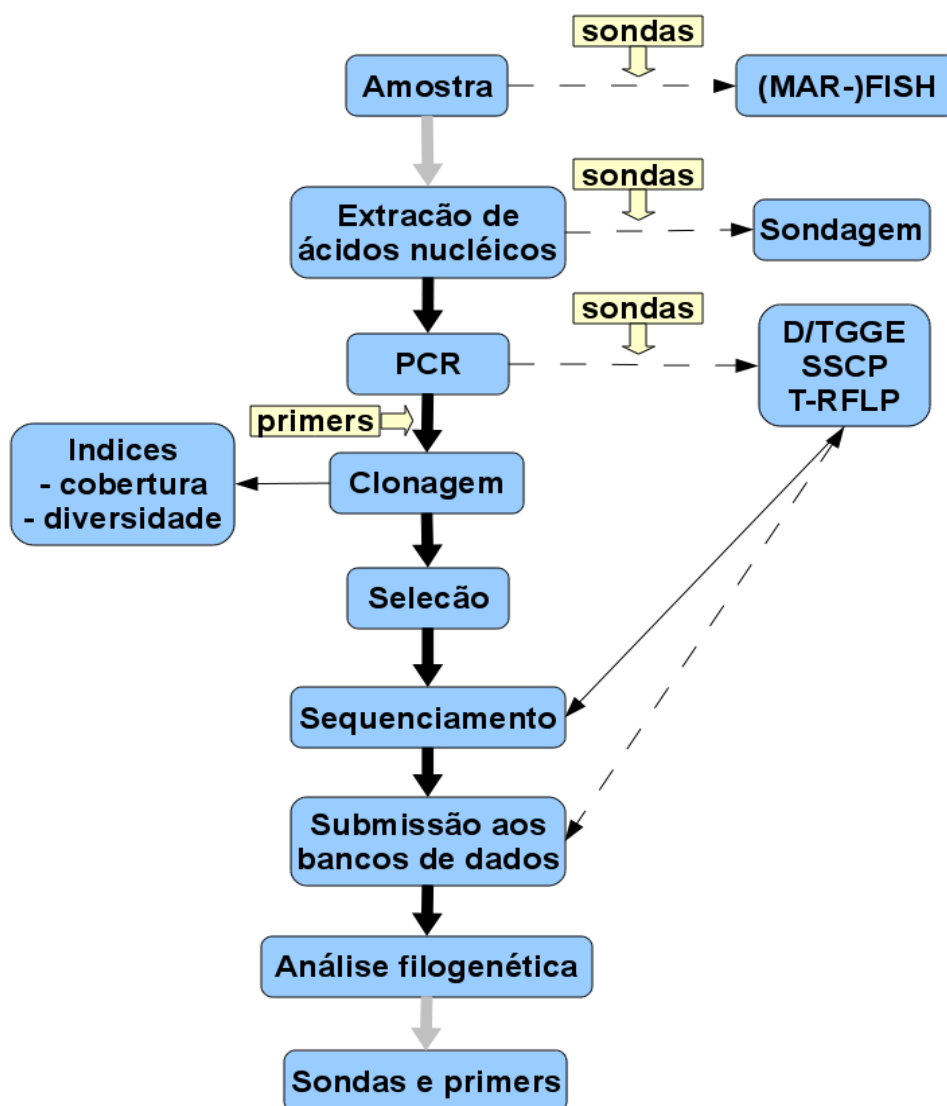


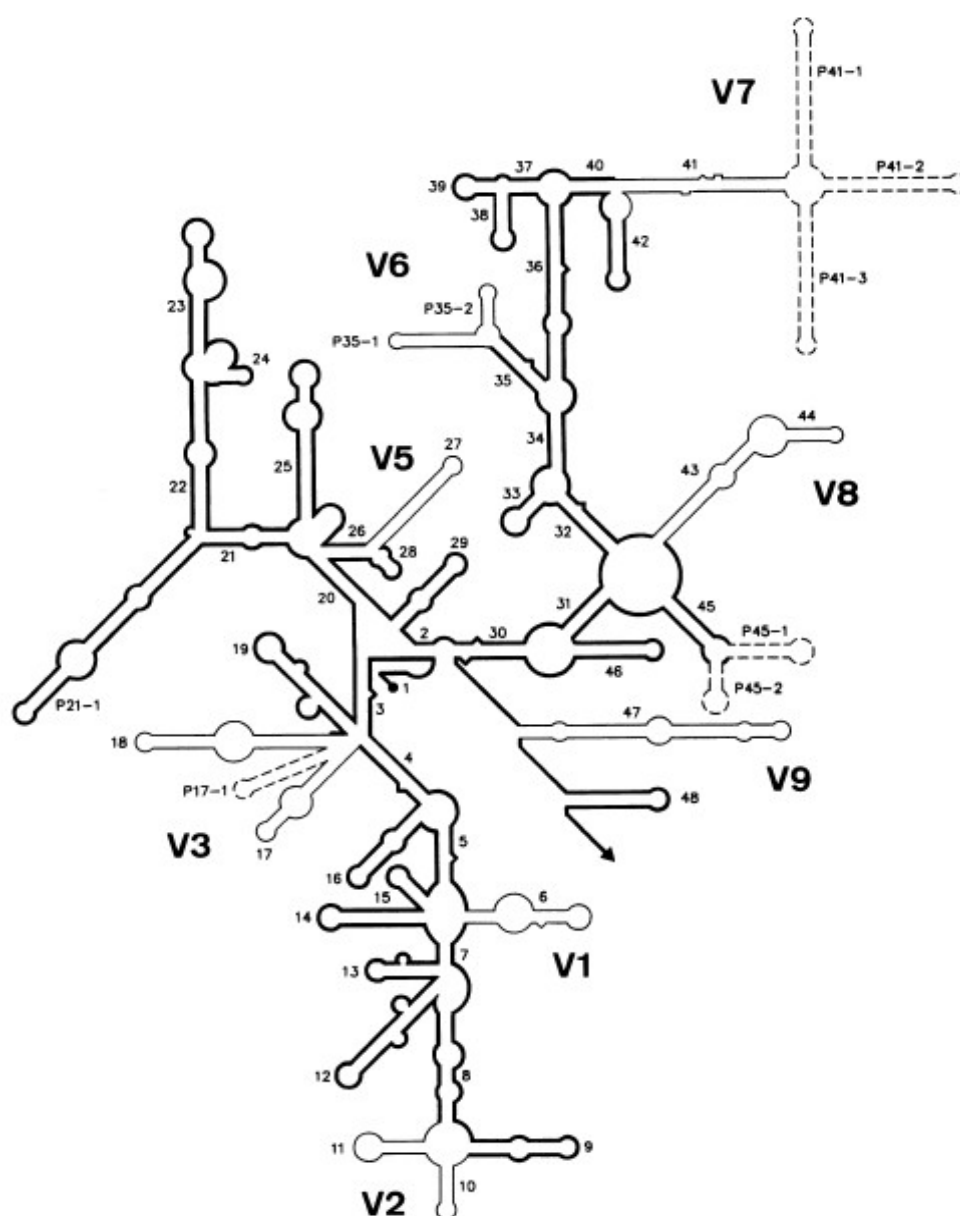
FIGURA 2. Fluxograma para análise da diversidade de microrganismos a partir de amostras ambientais com base em filogenia (setas pretas) e sua interação com outras técnicas moleculares (setas cinzas). MAR, microautorradiografia. Modificado de RÖLING & HEAD, 2005.

#### 1.4.2 Genes utilizados para análise em sistemática bacteriana e diversidade

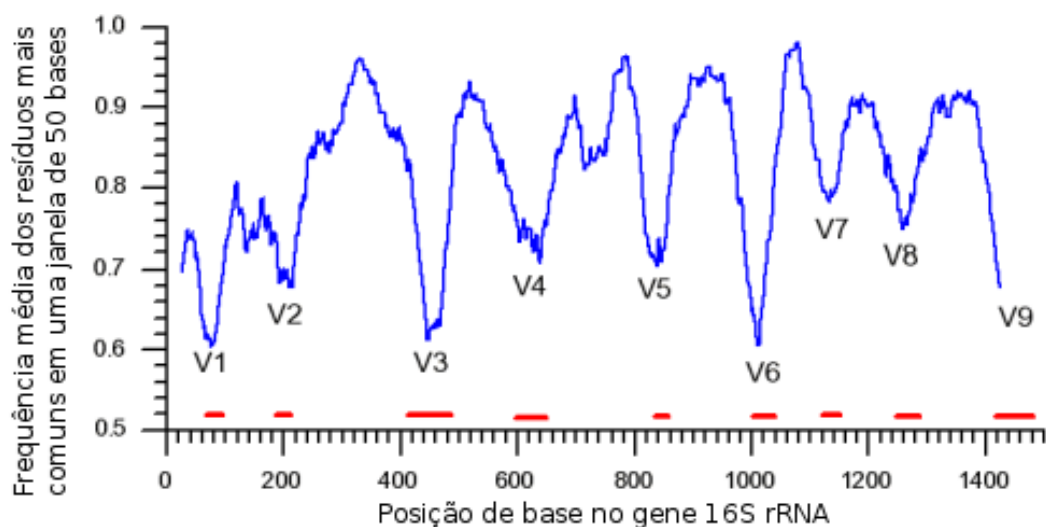
Inúmeros genes e/ou outras regiões do DNA são usadas na identificação de bactérias, como o 16S rRNA, 23S rRNA, região intergênica entre 16S-23S rRNA, genes essenciais como *rpoB* (codifica para a subunidade beta da RNA polimerase), *groEL* (codifica para proteína heat-shock), *gyrB* (codifica para a subunidade beta da DNA girase), *recA* (codifica para proteína envolvida na recombinação genética e reparo), entre outros. Estes genes oferecem a possibilidade de alvos “universais” ou de “amplo espectro” para a identificação de várias espécies de bactérias (DRANCOURT & RAOULT, 2005).

Na ecologia de microrganismos, o gene 16S rRNA permanece como o principal marcador genético usado. O gene está presente em todos os procariotos e seu produto mostra constância funcional: o 16S rRNA é parte do ribossomo que é constituído por uma subunidade maior (contendo as moléculas de RNA ribossomais de 23S e 5S e mais 31 proteínas) e pela subunidade menor (contendo a molécula de RNA ribossomal de 16S além de 21 proteínas) (WOODSON & LEONTIS, 1998) e são requeridos por todos os organismos na síntese de proteínas. O 16S rRNA, assim como o 23S rRNA, é uma molécula grande e constituída de muitos domínios, suficientemente longa (~1,5kb) para ser usada como um documento da história evolutiva (WOESE, 1987) e garantir uma quantidade de informação suficiente em análises de diversidade. Além disso, evidências de transferência lateral são limitadas e sua estrutura primária e secundária são constricta (RÖLING & HEAD, 2005). Finalmente as moléculas de RNA ribossômico são também consideradas os cronômetros moleculares mais úteis (ZUCKERKANDL & PAULING, 1962). Por ocorrem virtualmente em todos os organismos e a sequência mudar em taxas bastante diferentes internamente, o que faz com que estes genes apresentem variabilidades diferentes em regiões distintas do gene (LANE et al., 1985), podem ser usados através das regiões conservadas para o desenho de oligonucleotídios universais flanqueando regiões variáveis, úteis na

identificação taxonômica e/ou análise filogenética dos microrganismos. Devido a taxas de mutações diferentes em diferentes regiões da molécula (NEEFS, 1993), alguns domínios permaneceram quase universalmente constantes e são separados por regiões mais variáveis, específicas para grupos taxonômicos de filos até espécies. Isto permite o alinhamento de forma não ambígua de posições homólogas em uma sequência e a identificação de motivos de sequências universalmente conservadas ou de “assinaturas” *taxon* específicas (RÖLING & HEAD, 2005). A FIGURA 3 apresenta um modelo proposto para a estrutura secundária do 16S rRNA em procariotos, mostrando suas regiões conservadas e variáveis. Nove regiões variáveis, designadas de V1 a V9, foram originalmente identificadas (NEEFS et al., 1990) e são usadas em estudos de diversidade. Estas regiões variáveis são apresentadas também na forma de gráfico na FIGURA 4 e é possível perceber que algumas destas regiões possuem um grau maior de variação, como é o caso das regiões V1, V3 e V6, mais usadas em trabalhos de diversidade. A comparação de sequências dos genes rRNA, principalmente o 16S rDNA, é muito importante para a inferência de relações filogenéticas, bem como evolutivas entre micro-organismos (WEISBURG et al., 1991).



**FIGURA 3:** Regiões hipervariáveis no 16S rRNA de bactérias. São mostradas as 8 regiões hipervariáveis na molécula, de V1 a V9; em procariotos a região hipervariável V4 está ausente (NEEFS, 1993).



*FIGURA 4. Representação das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA. O gráfico reflete flutuações na variabilidade entre sequências do gene 16S rRNA alinhados; picos refletem alta conservação, enquanto vales correspondem às regiões hipervariáveis V1 a V9 indicadas pelas barras vermelhas; a análise foi feita a partir do alinhamento de 4.383 sequências de estirpes tipo de bactérias (ASHELFORD et al., 2005).*



O gene 16S rRNA tem sido utilizado como o principal marcador genético para determinar a diversidade total de bactérias no ambiente e inúmeros oligonucleotídeos iniciadores “universais” foram desenhados e usados para amplificar o gene de toda a comunidade de microrganismos em amostras ambientais. Entretanto, oligonucleotídeos iniciadores desenhados para serem complementares a regiões conservadas dos grupos presentes na árvore filogenética não necessariamente são complementares a todos aqueles que são representados nos bancos de dados atualmente (BAKER et al., 2003). Idealmente os oligonucleotídeos iniciadores universais devem ser específicos para o domínio em questão e complementares às sequências de todos os organismos pertencentes a este domínio (BAKER et al., 2003).

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores conservados deve ser feito considerando regiões conservadas. BAKER e colaboradores (2003) mostrou que cerca de 10% das bases do gene 16S rRNA é conservada, considerando uma amostra de 500 sequências de bactérias, mas a maior parte destas regiões não é contínua em todos os organismos, apresentando espaços (*gaps*) quando as sequências são alinhadas. Desta forma, nenhum oligonucleotídeo iniciador de comprimento suficiente pode ser desenhado que anele 100% com todas as bactérias (BAKER et al., 2003).

#### 1.4.3 Utilização do gene 16S rRNA na identificação de bactérias

Um dos mais atrativos potenciais usos do gene 16S rRNA é fornecer identificação em nível de gênero e espécie para isolados de bactérias. Alguns resultados indicam que a sequência do gene 16S rRNA fornece identificação em nível de gênero na maioria dos casos (>90%), mas em nível menor para espécies (65 a 83%) (JANDA & ABBOTT, 2007). Dificuldades encontradas na

obtenção de identificação para gênero e espécie inclui o reconhecimento de novas taxa, o número de sequências depositadas nos bancos de dados, espécies compartilhando sequências 16S rRNA similares e/ou idênticas, ou problemas na nomenclatura (JANDA & ABBOTT, 2007).

Embora o gene 16S rRNA seja útil na classificação de bactérias, ele possui baixa resolução filogenética em nível de espécie e pouco poder de discriminação para alguns gêneros e estudos de hibridização de DNA são necessários para melhor discriminação para estes problemas taxonômicos (JANDA & ABBOTT, 2007).

A identificação de rotina de isolados clínicos ou grupos específicos de bactérias com importância clínica usando o gene 16S rRNA tem mostrado que as taxas de identificação para espécies variam de 62 a 91%, comparado com os métodos convencionais ou comerciais (JANDA & ABBOTT, 2007).

Embora tenha sido demonstrado que dados de sequência do gene 16S rRNA de uma estirpe individual com sua vizinha mais próxima exibindo uma identidade <97% representa uma nova espécie, o significado da identidade >97% não é claro. Este valor pode representar uma nova espécie ou, alternativamente, indicar agrupamento dentro de um *taxon* estabelecido. A análise de hibridização DNA-DNA tem sido usada para fornecer respostas definitivas para tais questões. Enquanto o gene 16S rRNA pode ser usado para uma multiplicidade de finalidades, diferentemente da hibridização DNA-DNA (>70% de reassociação) não há um valor limite (por ex., 98,5% de identidade) acima do qual há um acordo universalmente aceito de que a identificação em nível de espécie seja definitiva e conclusiva (JANDA & ABBOTT, 2007).

Um problema em relação a resolução do gene 16S rRNA está na alta identidade entre diferentes grupos taxonômicos. A diferença entre a 1<sup>a</sup>. e a 2<sup>a</sup>. sequências mais próximas em uma busca por similaridade em um banco de dados, a partir da sequência do gene 16S rRNA de um isolado desconhecido,

quando é <0,5% de divergência (>99,5% de similaridade) a escolha entre uma ou outra espécie não se justifica (JANDA & ABBOTT, 2007). Em casos mais complicados, onde as sequências de espécies diferentes compartilham altas similaridade, resultados mais confiáveis tem sido obtidos quando o gene 16S rRNA é usado conjuntamente com o gene *rpoB* (DRANCOURT & RAOULT, 2005).

#### 1.4.4 Tendências na análise de diversidade baseada em bibliotecas do gene 16S rRNA

A amplificação do rDNA pode distorcer a estrutura aparente de uma comunidade como um resultado de tendências no número de cópias do rDNA celular, a extração do DNA e a amplificação por PCR (DUNBAR et al., 1999). oligonucleotídios iniciadores para diferentes regiões do gene 16S rRNA são usados, assumindo que o gene 16S rRNA de todas as bactérias podem ser amplificados com a mesma eficiência usando oligonucleotídios iniciadores universais. Entretanto, as bactérias podem apresentar diferente número de cópias do gene 16S rRNA, dependendo da espécie (RÖSCH et al., 2005), variando de 1 a 15 em bactérias e de 1 a 4 em arqueias (LEE et al., 2009). Tendências na amplificação, clonagem e sequenciamento do DNA são também reportados. Desta forma, a caracterização de uma comunidade a partir da amplificação, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA fornece dados relativos a riqueza, mas pouco em relação a equitabilidade das bactérias (RÖSCH et al., 2005).

A seleção de oligonucleotídios iniciadores é de crucial consideração e irá depender da aplicação particular e se serão usados os genes rRNA de uma grande variedade de organismos ou grupos específicos (RÖLING & HEAD, 2005).

Uma das principais questões em relação a amplificação usando amostras de DNA ambientais é superar a inibição da PCR por substâncias extraídas conjuntamente com os ácidos nucleicos. Acredita-se que estes inibidores sejam constituídos principalmente por ácidos húmicos. Um método simples, frequentemente usado, para contornar este problema é a diluição da solução de DNA para reduzir os níveis de contaminantes inibidores da PCR. A adição de albumina serosa bovina (400 ng/μL) ou a proteína codificada pelo gene 32 do fago T4 (150 ng/μL) também podem levar a uma maior tolerância a contaminantes. Além disso, diferentes DNA polimerases possuem diferentes níveis de tolerância a inibidores (RÖLING & HEAD, 2005).

A PCR pode dar origem a inúmeros artefatos, como mutações, deleções e quimeras. As enzimas DNA polimerases podem introduzir mutações pontuais devido a incorporação de nucleotídeos errados e sua frequência irá depender do tipo de DNA polimerase usada. Entretanto, o grau de erro resultante da incorporação de nucleotídeos errados é geralmente baixa comparada a diferenças nas sequências de rDNA. A proporção de sequências com erros aumenta com o número de ciclos da PCR e o comprimento do fragmento amplificado. Um segundo tipo de erro observado ocorre devido a estabilidade na estrutura secundária do rRNA, resultando em deleções e fragmentes de PCR menores. Finalmente, um terceiro erro comumente observado é a formação de quimeras, como resultado de síntese incompleta de um fragmento do gene rRNA durante a amplificação. Se o fragmento incompleto anela a um gene rRNA homólogo formando um heteroduplex, ele pode ser completamente estendido. Isto resulta em um fragmento amplificado do gene rRNA que não existe naturalmente. A frequência de ocorrência de quimeras pode chegar a 30% e é aumentada pela disponibilidade de fragmentos de rDNA parciais e por sequências que compartilham alto grau de identidade e que podem, após sua desnaturação e formação de DNA simples

fita, anelar em regiões complementares. A incorporação de nucleotídeos errados e a formação de quimeras leva a uma sobre estimativa da diversidade (RÖLING & HEAD, 2005).

Além dos artefatos produzidos na PCR, amplificação diferencial também é uma fonte de erros na estimativa da diversidade. Abundância quantitativa de espécies a partir de PCR somente pode ser inferida quando todas as moléculas são igualmente acessíveis à hibridização com o oligonucleotídeo iniciador, quando os híbridos oligonucleotídeo iniciador/DNA molde são formados com a mesma eficiência e a DNA polimerase estende todos os DNA moldes com igual eficiência, através de toda a reação de PCR. Isto não ocorre em reações de PCR e várias tendências, relacionadas ao DNA molde e a abordagem de PCR usada, comprometem a capacidade de obter conclusões quantitativas. Problemas relacionados ao DNA molde são: números de cópias do gene 16S rRNA, heterogeneidade do operon rRNA, diferenças no conteúdo GC, presença de sequências além da sequência alvo, que inibem a reação, modificação no DNA molde (por ex., metilação) e a concentração do DNA molde. Por outro lado, amplificação diferencial relacionada a abordagem de PCR pode ocorrer devido a eficiência do oligonucleotídeo iniciador e seletividade e competição entre anelamento de oligonucleotídeo iniciador e reanelamento do DNA molde (RÖLING & HEAD, 2005).

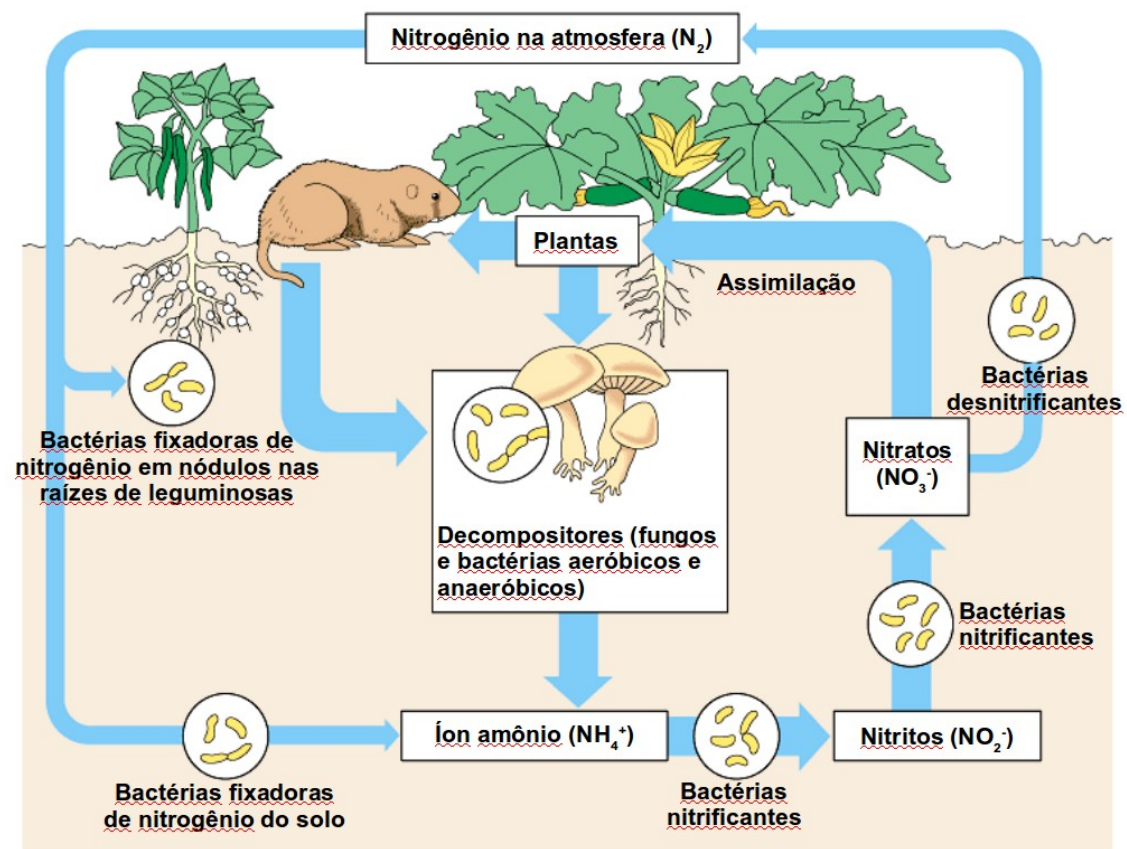
Assim como na PCR, a etapa de clonagem não necessariamente irá conduzir a uma correta representação da comunidade microbiana original (RÖLING & HEAD, 2005).

Diferentes marcadores ou regiões de uma molécula terão diferenças na capacidade de distinguir comunidades através de abordagens baseadas em OTU. Em geral, o agrupamento em OTU é somente tão preciso quanto o alinhamento das sequências. Regiões hipervariáveis, consideradas como possuindo maior potencial para diferenciar filotipos muito próximos, são difíceis

de alinhar corretamente e podem, portanto, influenciar o agrupamento em OTU, particularmente em grandes conjuntos de dados, onde a correção manual do alinhamento se torna inviável.

#### 1.4.5 Genes funcionais do metabolismo de nitrogênio para avaliação da diversidade de grupos específicos

O Nitrogênio é um fator limitante para o crescimento dos vegetais, sendo usado na constituição de muitos adubos utilizados na agricultura. As bactérias desempenham importantes papéis em várias etapas do ciclo biogeoquímico do nitrogênio (FIGURA 5) e, desta forma, a disponibilidade e as formas deste elemento em ambientes como o solo, estão diretamente ligados a sua diversidade. Como exemplo, apesar da predominância atmosférica deste elemento em sua forma molecular ( $N_2$ ), animais e vegetais não possuem a capacidade de assimilar o  $N_2$  da atmosfera. Apenas alguns procariotos, associativas, simbióticas e de vida livre, possuem a capacidade de reduzir o  $N_2$  a  $NH_3$  (JAMES, 2000). A fixação biológica de nitrogênio contribui com aproximadamente 65% do total de nitrogênio fixado, na forma de amônia a partir do nitrogênio atmosférico (NEWTON, 1999). Neste processo o gene *nifH* codifica para a proteína nitrogenase redutase e é o gene mais frequentemente usado para a determinação da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (RÖSCH et al., 2002). O gene *nifH* é muito conservado, isto é, tem uma variação pequena na sequência de bases entre bactérias (RUVKUN e AUSUBEL, 1980).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**FIGURA 5:** Ciclo do nitrogênio.

Para outros processo do ciclo, como a nitrificação, poucos oligonucleotídeos iniciadores tem sido desenvolvidos para amplificação de enzimas chave como, por exemplo, o gene *amoA*, que codifica para a subunidade da enzima amônio mono-oxigenase, devido às dificuldades experimentais na amplificação deste gene. Além do mais, técnicas moleculares não permitem ainda a identificação de organismos heterotróficos nitrificantes, que parecem ser os principais organismos participantes da oxidação de amônio via nitrito a nitrato em solos aerados (RÖSCH et al., 2006).

Por sua vez, o processo de desnitrificação tem sido melhor investigado, entretanto sua caracterização é dificultada pelo fato de que cada etapa, com exceção da redução do  $N_2O$ , é catalizada por, no mínimo, duas enzimas (RÖSCH et al., 2006). Nitrato redutase dissimilatórias contém citocromo *cd1* ou Cu em seu grupo prostético, e as bactérias possuem uma destas duas enzimas ou nenhuma. A enzima nitrato redutase contendo cobre, assim como o complexo da nitrogenase, está distribuída entre bactérias de taxa não relacionados (BOTHE et al., 2000). O gene *nirK* codifica para a nitrato redutase contendo  $Cu^{+2}$  e tem sido utilizado para acessar a distribuição de bactérias em amostras ambientais (RÖSCH et al., 2002; PRIEMÉ et al., 2002; THROBÄCK et al., 2004).

#### 1.4.6 Índices e estimadores da Diversidade Bacteriana

O conceito de diversidade envolve dois parâmetros: riqueza, que é a quantidade de espécies, e abundância relativa, que é a quantidade de indivíduos de uma determinada espécie (DIAS, 2004). A riqueza e a diversidade de espécies dependem, além da própria natureza da comunidade, do esforço amostral despendido, uma vez que o número de espécies aumenta



com o aumento do número de indivíduos amostrados. As curvas de acumulação de espécies (curvas do coletor) ou de rarefação permitem avaliar o quanto um estudo se aproxima de capturar todas as espécies do local. Quando a curva estabiliza, ou seja, nenhuma espécie nova é adicionada, significa que a riqueza total foi obtida. A partir disso, novas amostragens não são necessárias. A estabilização da curva é difícil e medidas de riqueza de espécies que permitam estimar a riqueza a partir dos dados obtidos, ou comparar inventários entre diferentes áreas com diferentes unidades amostrais são bastante úteis (BARROS, 2009). Os estimadores que se baseiam na riqueza das espécies raras compartilhadas entre grupos de amostras fazem também uso de alguns outros conceitos importantes (COLWELL, 2004; DIAS, 2004): a) *singletons*, espécies com somente um indivíduo; b) *doubletons*, espécies com somente dois indivíduos; c) *uniques*, espécies que ocorrem em somente uma amostra; e d) *duplicates*, espécies que ocorrem em somente duas amostras.

Um outro grande problema enfrentado na análise da diversidade de bactérias e arqueias é a ausência de valores pré-determinados que possam ser usados na determinação das espécies. Infelizmente, nenhuma definição universal existe para identificação de espécies através do gene 16S rRNA (JANDA & ABBOTT, 2007). Para contornar este problema, nos estudos de diversidade microbiana é utilizado o conceito de *Operational Taxonomic Units* (OTU), ou Unidade Taxonômica Operacional, ou ainda Filotipos (NUBEL et al., 1999; STACH et al., 2003). Estas unidades taxonômicas podem referir-se a qualquer nível taxonômico, requerendo apenas uma definição explícita dos seus limites. Por exemplo, identidade maior ou igual a 97% em um alinhamento de fragmentos do gene 16S rRNA, valor normalmente usado como uma aproximação para espécies. Similaridade maior ou igual a 95%, como uma aproximação para gênero e maior ou igual a 80% como uma aproximação para filo (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; BORNEMAM e TRIPLETT, 1997). O

uso de OTU é apropriado para comparar riqueza relativa quando sequências do gene 16S rRNA são avaliadas de acordo com a mesma região no gene (STACH et al., 2003).

Métodos paramétricos (ex., assumem uma distribuição normal para os dados) e não-paramétricos (não assumem uma distribuição prévia) são utilizados para se medir a diversidade microbiana e tratam principalmente da riqueza de espécies, porém a abundância relativa deve também ser levada em conta (MAGURRAN, 1988). A topologia de árvores filogenéticas também é utilizada em análises da diversidade para mostrar a proximidade das sequências obtidas a partir de amostras ambientais com grupos taxonômicos conhecidos e também em alguns métodos que permitem comparar a estrutura de diferentes comunidades.

Métodos paramétricos como Lognormal (PRESTON, 1948), por exemplo são capazes de estimar a diversidade bacteriana a partir de pequenas amostras de indivíduos de um determinado ambiente, sendo ideal para estimar a imensa diversidade de micróbios. Por outro lado, a primeira medida não-paramétrica de diversidade foi proposta por Simpson (SIMPSON, 1949). Simpson sugeriu que a diversidade era inversamente relatada pela probabilidade de que dois indivíduos escolhidos ao acaso pertencessem à mesma espécie (KREBS, 1998). A medida mais popular de diversidade de espécies é o índice de Shannon, designado pela letra “H” (SHANNON e WEAVER, 1949). Esta medida é baseada na teoria da informação, sendo considerada uma medida da incerteza de que duas sequências pertençam à mesma OTUs. Quanto maior o valor de  $H'$ , maior a incerteza (KREBS, 1998).

Os métodos não paramétricos estimam a riqueza de espécies a partir de uma pequena amostra sem assumir um modelo em particular (HUGHES et al., 2001). Tais abordagens consideram a proporção de OTU reamostradas ou recapturadas em relação aqueles observados uma única vez. A probabilidade

de detectar uma OTU mais de uma vez será maior em amostras de comunidades menos diversas e menor em comunidades mais diversas. (BOHANNAN e HUGHES, 2003). Um estimador não-paramétrico muito utilizado é o índice Chao1, particularmente apropriado para estimar a diversidade de dados de comunidades microbianas (CHAO, 1987; BREITBART et al., 2002). A maior parte dos dados sobre diversidade microbiana disponíveis atualmente são moleculares, geralmente de genes ribossomais. Uma estimativa que pode ser feita pelo método da rarefação (SANDERS, 1968; SIMBERLOFF, 1972). Outros métodos são utilizados para estimar a riqueza de OTUs na comunidade, tais como o estimador Jackknife baseado na frequência observada de OTUs raras e o estimador Bootstrap definido por sub amostragens aleatórias do conjunto de OTUs, além de outros métodos não-paramétricos, como o estimador *Abundance based Coverage Estimator* (ACE).

#### 1.4.7 Ferramentas computacionais para análise da diversidade a partir de dados de sequências de DNA

Inúmeras ferramentas para análise descritiva e comparativa de comunidades microbianas baseadas em técnicas independentes de cultivo, que usam sequências de DNA geradas a partir de bibliotecas do gene 16S rRNA (ou outro marcador) construídas a partir de fragmentos amplificados por PCR, estão atualmente disponíveis.

De forma geral estas análises são feitas através do uso de diferentes programas, necessários em cada uma das etapas de análise, desde a chamada de bases das leituras de sequências até a comparação da estrutura de diferentes comunidades. Algumas destas ferramentas, específicas para análise da diversidade usando sequências de DNA são listadas na TABELA 1. Inicialmente, ferramentas para análise de qualidade e edição das sequências

são necessários, como PHRED (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998) e BioEdit (HALL, 1999). Mitas das análises posteriores e testes estatísticos partem das sequências alinhadas ou de matrizes de distâncias genéticas. Além disso, alguns métodos de análise utilizam árvores filogenéticas ou estas constituem uma forma de análise *per se*. Para estes fins, programas como Clustal (THOMPSON et al., 1994a; THOMPSON et al., 1994b), Infernal (NAWROCKI et al., 2009), NAST (DeSANTIS et al., 2006), PHYLIP (FELSENSTEIN, 2005), ARB (LUDWIG et al., 2004) e MEGA (TAMURA et al., 2007), dentre muitos outros, são largamente empregados.

Uma importante etapa das análises consiste em verificar a formação de quimeras. Diferentes algoritmos e programas foram desenvolvidos com este propósito, sendo os mais conhecidos: BELLEROPHON (HUBER et al., 2004), CHIMERA CHECK (COLE et al., 2009), Ccode (GONZALEZ et al., 2005) e PINTAIL (ASHELFORD et al., 2005). Entretanto, os programas tem dificuldades em reconhecer quimeras quando as sequências formadoras possuem mais de 85% de homologia. Normalmente as quimeras são geradas a partir de sequências mais próximas, sendo mais difíceis de detectar. Desta forma, os resultados destas análises devem ser usados apenas como guias, cabendo ao usuário a decisão final. A ocorrência de quimeras é melhor detectada através da uma análise filogenética a partir de sequências das pontas opostas do rRNA. Se a sequência é uma quimera, a árvore gerada será incongruente, mas se a sequência é verdadeira, a árvore gerada deverá ser idêntica ou muito similar (RÖLING & HEAD, 2005).

Outra importante etapa das análises é o agrupamento das sequências em OTU. Um programa muito usado nesta etapa é o DOTUR, que agrupa sequências de DNA em OTU usando uma matriz de distâncias genéticas, calculada entre cada par de sequências, e um algoritmo para agrupamento (ex, UPGMA). Com as sequências agrupadas em OTU, o programa permite criar

curvas de rarefação e do coletor para o número de espécies observadas, índices de diversidade e de riqueza. O programa permite o agrupamento das sequências em OTU a partir de diferentes valores de distância, não estando limitado a um único (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005).

A complexidade ecológica e filogenética das comunidades microbianas requer também o desenvolvimento de novos métodos para determinar se duas ou mais comunidades possuem a mesma estrutura, mesmo que não seja possível amostrar as comunidades exaustivamente (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006c). Dentre os métodos disponíveis, três são, atualmente, bastante difundidos para abordar esta questão: análise baseada na estatística de Cramér-von Mises a partir de uma matriz de distâncias genéticas, teste de parcimônia e o método de UniFrac. Os dois últimos baseados em árvores filogenéticas.

O teste baseado na estatística de Cramér-von Mises foi inicialmente implementado no programa LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001) e posteriormente modificado no programa J-LIBSHUFF (SCHLOSS et al., 2004). Este teste usa a matriz de pares de distâncias genéticas para determinar se duas amostras partem de uma mesma população ou se uma é um sub-grupo da outra. O teste apresenta duas principais limitações: i) a necessidade de realizar dois testes de hipótese para cada par de amostra comparada e ii) a necessidade de usar uma abordagem baseada em distância genética e a impossibilidade de aplicar outros métodos de análise filogenética, como parcimônia, máxima verossimilhança ou Bayesiana, nas comparações (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006c). Além disso, a partir de simulações para comparar diferentes testes de hipótese para análise da diversidade, foi observado que os testes realizados pelos programas LIBSHUFF e J-LIBSHUFF não são capazes de determinar, na comparação entre duas comunidades, se uma representa um sub-grupo da outra (SCHLOSS, 2008).

Lozupone e Knight introduziram um novo método para calcular diferenças entre comunidades microbianas baseado na informação filogenética, chamado UniFrac (LOZUPONE & KNIGHT, 2005). Este método mede a distância filogenética entre grupos de taxa em uma árvore filogenética como a proporção dos comprimentos dos ramos da árvore que leva aos descendentes a partir de um ambiente ou outro, mas não ambos. O método pode ser usado para determinar se comunidades são significativamente diferentes, para comparar várias comunidades simultaneamente usando técnicas de agrupamento e ordenação e para medir a contribuição relativa de diferentes fatores, tais como químicos e geográficos, para a similaridade entre amostras (LOZUPONE & KNIGHT, 2005).

O teste de parcimônia parte também de uma árvore filogenética construída a partir do conjunto de dados e com as sequências identificadas com a amostra ou tratamento a que pertencem. O método irá calcular o menor número (mais parcimonioso) de transições que podem ser obtidas para explicar a covariação da filogenia com os tratamentos usando o algoritmo de Fitch (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006c). Este método foi implementado no programa TreeClimber (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006c).

O programa SONS compara os membros e as estruturas em comunidades considerando a distribuição de abundância de OTU que são endêmicas para uma comunidade ou compartilhadas por duas comunidades (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006b).

Recentemente, um programa chamado Mothur foi desenvolvido com o objetivo de ter uma única fonte para analisar dados moleculares que são usados em ecologia microbiana (SCHLOSS et al., 2009). A plataforma abriga os algoritmos implementados em ferramentas anteriores, incluindo DOTUR, SONS, TreeClimber, LIBSHUFF, J-LIBSHUFF e UniFrac.

Além destas implementações, características adicionais foram incorporadas, incluindo i) mais de 25 cálculos para quantificar parâmetros ecológicos para medidas de diversidade alfa e beta; ii) geração de gráficos; iii) funções para varredura de sequências baseada em qualidade; iv) alinhamento baseado em NAST; v) cálculo de distâncias genéticas entre pares de sequências; vi) ambiente próprio de análise através de comandos (SCHLOSS et al., 2009). Este ambiente trouxe uma integração necessária para as análises, aumentando sua flexibilidade, facilidade, comodidade e rapidez.

**TABELA 1. Ferramentas usadas em ecologia microbiana para descrever e comparar comunidades microbianas<sup>1</sup>.**

Programa	Aplicação	Entrada	Referência
DOTUR/Fast Group	Agrupa sequências em OTU baseado em distâncias genéticas e constroi curvas de rarefação e do coletor para estimadores de riqueza e diversidade.	Matriz de distâncias	SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005; SEGURITAN & ROHWER, 2001
SONS	Calcula curvas do coletor para OTU estimativas da fração e riqueza de OTU compartilhadas entre comunidades.	OTU	SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006
β-LIBSHUFF	Usa a estatística de Cramer-von Mises para testar se a estrutura de duas comunidades são a mesma, diferente ou um subgrupo uma da outra.	Matriz de distâncias	SCHLOSS et al., 2004; SINGLETON et al., 2001
TreeClimber	Implementa um teste baseado em parcimônia para determinar se as estruturas de duas ou mais comunidades são significativamente diferentes.	Árvore filogenética	SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006
UniFrac	Compara as distâncias filogenéticas entre pares de comunidades para descrever a similaridade das suas estruturas.	Árvore filogenética	LOZUPONE & KNIGHT, 2005
AMOVA	Usa um tipo de análise de variância para determinar se as diversidades genéticas na estrutura de duas ou mais comunidades são significativamente diferentes.	Matriz de distâncias	MARTIN, 2002
MOTHOR	Ambiente integrado incluindo ferramentas como DOTUR, SONS, TreeClimber, β-LIBSHUFF, UniFrac, análise de quimeras, alinhamento, cálculo de distâncias genéticas, índices e estimadores de riqueza e diversidade, gráficos, etc.	Diversas	SCHLOSS et al., 2009

<sup>1</sup>Modificado de SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006.



A identificação das sequências através da similaridade com sequências de organismos conhecidos, depositadas em bancos de dados públicos também é largamente usada e permite estabelecer os grupos taxonômicos presentes nas comunidades e, de forma geral, o papel destes grupos no ambiente. Enquanto as estimativas de diversidade e comparações entre amostras baseiam-se em cálculos de distâncias genéticas ou relações filogenéticas entre as sequências obtidas nas amostras, a identificação taxonômica dos organismos a partir das sequências dependem de comparação com bancos de dados. A comparação é feita através de alinhamentos locais entre a sequência em questão e sequências similares presentes no banco de dados. O algoritmo mais utilizado é, sem dúvida, o BLAST e suas variações (ALTSCHUL et al., 1990). Entretanto, a ferramenta do RDP II, conhecida como CLASSIFIER, que compara fragmentos de 8 bases entre a sequência analisada e aquelas presentes no banco de dados e utiliza uma estatística Bayesiana para determinar a classificação taxonômica (WANG et al., 2007) é também bastante utilizada. Bancos de dados gerais (ex., GenBank) são normalmente utilizados, assim como bancos de dados especializados, que mantêm uma coleção atualizada e curada. Bancos de dados para o gene 16S rRNA (TABELA 2) são os que contém o maior número de sequências e os mais frequentemente usados, mas bancos de dados para genes funcionais também estão surgindo (<http://fungene.cme.msu.edu/index.spr>). Estes bancos de dados especializados obtêm informação a partir de bancos de dados gerais, mas possuem a vantagem de preprocessar e filtrar os dados, removendo sequências de baixa qualidade. Estes bancos de dados disponibilizam também as sequências em diferentes formatos, necessários para utilização em programas de análise de diversidade e/ou filogenética (ex., Mothur, ARB, etc.), e diversas ferramentas de análise (ex., análise de quimeras, alinhamento, identificação taxonômica, etc).

Devido à taxa de produção de sequências do gene 16S rRNA para organismos não cultivados atualmente exceder a taxa de produção dos organismos cultivados relacionados, o posicionamento taxonômico das sequências sofre um grande atraso. Foi verificado que 43% das sequências para o gene 16S rRNA de comprimento inteiro no GenBank estão classificadas simplesmente como “amostra ambiental” e “não classificada” (DeSANTIS et al., 2006). Além disso, problemas com relação ao tamanho da sequências, qualidade dos dados e formação de quimeras dificultam a identificação de organismos através da sequência do gene 16S rRNA. Alguns bancos de dados especializados, mantêm somente sequências de alta qualidade e disponibilizam inúmeras ferramentas que facilitam a análise da diversidade.

TABELA 2. Bancos de dados especializados em RNA ribossomais.

Banco de dados <sup>1</sup>	No. de sequências	
	SSU rDNA <sup>2</sup>	LSU rDNA <sup>2</sup>
RDP II 10.23 – 07/12/2010 Contém sequências de 16S rDNA de Bactérias e Archaea COLE et al., 2009 (rdp.cme.msu.edu)	1.483.016	
SILVA 104 – 15/10/2010 Contém sequências 16S/18S rDNA e 23S/28S rDNA de Bactérias, Archaea e Eucariotos; banco de dados oficial do programa ARB PRUESSE et al., 2007 (www.arb-silva.de)	1.471.257	207.686
Greengenes – 16/12/2010 Contém sequências de 16S rDNA de Bactérias e Archaea DeSANTIS et al., 2006 (greengenes.lbl.gov)	726.099	
The European Ribosomal RNA Database Contém sequências SSU e LSU rDNA de Bactérias, Archaea, Eucariotos, Mitocôndrias e Plastídeos; iniciado em 1984 e descontinuado em 2007; não é mais mantido (bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA)	20.460	1.322

<sup>1</sup>Primeira linha – nome do banco de dados seguido pelo número (quando disponível) e data do *release*; segunda linha – apresenta as principais características do banco de dados; terceira linha – referência seguida da URL.

<sup>2</sup>SSU rDNA representa o gene 16S rDNA ou os genes 16S/18S rDNA, dependendo do banco de dados; LSU rDNA representa o gene 23S rDNA ou os genes 23S/28S rDNA, dependendo do banco de dados.

## **2 OBJETIVO**

Determinar a diversidade de bactérias do solo aderido à raiz de cana-de-açúcar no estado do Paraná, em tempos diferentes e sob diferentes regimes de adubação, utilizando método independente de cultivo.

### **3 JUSTIFICATIVA**

O estudo da diversidade de micro-organismos do solo é importante para conhecer a relação de micro-organismos com as plantas. Entre estas relações destacam-se as trocas de nutrientes entre certas espécies de bactérias e plantas, a participação de microrganismos nos ciclos biogeoquímicos, como do nitrogênio, entre outras. O solo é também um repositório de microrganismos com potencial biotecnológico. Em particular há um interesse especial nestas relações com plantas cultivadas. A diversidade bacteriana nos solos sob cultivo agrícola é grande, muito variável e ainda pouco compreendida. É importante conhecer a função destas comunidades bacterianas no solo e seus efeitos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental e amostragem

Este projeto foi desenvolvido em colaboração com a estação experimental da UFPR em Paranavaí (23°05'30"S/052°29'04"O), onde foi feito o plantio e cultivo da cana-de-açúcar da variedade **RB-72454**, cujas amostras de rizosfera foram utilizadas. Foram plantados dois blocos com 4 fileiras de plantas de cana-de-açúcar a partir de toletes (cana planta), com espaçamento de 50cm entre fileiras. Um dos blocos recebeu adubação nitrogenada, na forma de ureia, de 90kg/ha enquanto o segundo bloco não foi adubado com nitrogênio. Ao longo de 1 ano de plantio, em intervalos de aproximadamente 45 dias, as amostras foram enviadas ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR em Curitiba para análise da diversidade de bactérias. As amostras consistiram de raízes com solo aderido.

### 4.2 Tratamento das amostras no laboratório

A parte aérea foi retirada e o solo aderido à raiz foi cuidadosamente retirado sacudindo as raízes manualmente e recolhendo-se o solo desprendido. Este material desprendido da raiz foi homogeneizado em um recipiente plástico e uma porção foi transferida para tubos plásticos de 50mL e estocadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Todo o material usado na manipulação das plantas foi autoclavado e/ou esterilizado com álcool e flambagem durante o procedimento de extração.

### 4.3 Extração de DNA das bactérias do solo

A extração do DNA total do solo das amostras coletadas foi realizada a partir de 1g de solo utilizando o kit “UltraClean Soil DNA Kit” (*MO BIO laboratories, Inc*), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

### 4.4 Amplificação dos genes de 16S rDNA, *nifH* e *nirK*

As amostras preparadas de acordo com o item anterior foram usadas como DNA molde para a amplificação do gene 16S rRNA, *nifH* e *nirK* por PCR. Na reação de PCR foi utilizado de 50 a 100ng de DNA molde, medido em Qubit (Invitrogen), 5μL de tampão (220 mM de tris-HCl, KCl 100 mM, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 50 % (v/v) de glicerol), 1,5 μL de Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub> 50 mM), 2 μL de dNTP, 0,5 μL de *iniciadores* específicos (10 pMol/μL). 0,5 μL de Taq DNA polimerase 5U/μL, H<sub>2</sub>O estéril para completar o volume para 50 μL.

O programa utilizado no termociclador automático foi 1 ciclo de 94 °C por 3 min, 25 ciclos de: 94 °C por 45 seg, 62 °C por 45 segundos (esta temperatura varia de acordo com o par de *iniciador* utilizado no PCR), 72 °C por 1 min e 30 seg, finalmente um ciclo de 72 °C por 10 min. Na amplificação do gene 16S rRNA foram usados os *iniciadores* 27F (AGAGTTTGATC(**C/A**)TGGCTCAG) e 1492R (TACGG(**C/T**)TACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991). Os *iniciadores* para amplificação dos genes *nifH* foram o *nifH*-F(AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC) e *nifH*-R (TTGTTSGCS GCRTACATSGCCATCAT), e para a amplificação do gene *nirK* das amostras foi usado o par K15-F (GGCATGGTACCTTGGCACGTAACCTCGGGC) e o iniciador K16-R (CATTAGATCGTCGTTCCAATCACCGGT) (RÖSCH et al., 2002), sendo o restante do sistema de PCR, o mesmo.

O ciclo de amplificação do par de *iniciadores* de *nifH* e *nirK* foi o seguinte: 1 ciclo de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e alongação a 72°C por 30 segundos; 2 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos e alongação a 72°C por 35 segundos; 3 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos, e alongação a 72°C por 40 segundos; 4 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e alongação a 72°C por 45 segundos; 5 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e alongação a 72°C por 50 segundos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos e alongação a 72°C por 60 segundos; e uma extensão final de 72°C por 10 min (RÖSCH et al., 2002). Para confirmação da amplificação, 2,5 µL da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de ágar a 1% em tampão TBE. A eletroforese foi conduzida a 50V por aproximadamente 2 horas.

#### 4.5 Purificação dos produtos de amplificação por PCR

Para a purificação dos fragmentos de DNA obtidos, 15 µL acetato de amônio 7,5 mol/L e 40 µL de etanol 100% (1 volume) foram adicionados ao amplificado. Os tubos foram incubados no gelo por 30 minutos e centrifugados por 20 minutos a 13.000 g. O DNA foi lavado com etanol 70% duas vezes, seco a vácuo e dissolvido em 20 µL de água ultra pura estéril. Essa reação foi feita utilizando-se um termociclador automático (Eppendorf) utilizando-se 35 ciclos de reação a 95 °C por 20 segundos e 60 °C por 2 minutos.



#### 4.6 Análises de ARDRA

Fragments de PCR do gene 16S rRNA, de aproximadamente 1.500 pb, obtidos a partir do DNA total extraído de todas as amostras de solo de rizosfera, foram utilizados em análises de ADRDRA. Estes fragmentos foram digeridos separadamente com 4 enzimas de restrição (*Sau3AI*, Invitrogen; *HinfI*, Fermentas; *HaeIII*, Invitrogen; and *RsaI*, Invitrogen) no seguinte sistema de reação: 0,2 µL de enzima (10 U/µL), 1 µL de tampão, 5 µL do amplificado de DNA (aproximadamente 100 ng) e o volume foi completo para 10 µL de reação total com água estéril ultrapura. Os fragmentos obtidos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, em tampão TBE. A eletroforese foi conduzida a 30V por aproximadamente 4 horas.

#### 4.7 Análise de RFLP dos genes *nifH* e *nirK*

Fragments de PCR do gene *nifH* e *nirK*, de aproximadamente 500 pb e 400 pb, respectivamente, obtidos a partir do DNA total extraído das amostras 0 (controle), 4 (planta com 7 meses) e 7 (planta com mais de 1 ano de idade) do solo da rizosfera, foram utilizados em análises de RFLP. Estes fragmentos foram digeridos separadamente com 3 enzimas de restrição (*AluI*, *HaeIII* e *RsaI*) cada um utilizando-se o seguinte sistema de reação: 0,2 µL de enzima (10 U/µL), 1 µL de tampão, 5 µL do amplificado de DNA (aproximadamente 100 ng) e o volume foi completo para 10 µL de reação total com água estéril ultrapura. Os fragmentos obtidos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, em tampão TBE. A eletroforese foi conduzida a 30V por aproximadamente 4 horas.

#### 4.8 Análise de agrupamento para os experimentos de ARDRA e RFLP

Após a restrição dos amplificadores de 16S, *nifH* e *nirK*, foi construída uma matriz binária, com os dados obtidos da análise do universo total de fragmentos, do perfil gerado pelas enzimas. Utilizou-se para a captura dos dados de cada um dos géis o software LabWorks Bioimaging System (<http://uvp.com/systemsoverview.html>). Para cada posição de migração dos fragmentos foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de fragmento. Os valores gerados, pela posição de migração, para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard utilizando-se a correlação de *Pearson* (MATHWORLD). Para o cálculo de distâncias e clusterização foi utilizado o *Software Orange Data Mining* (AILAB/ORANGE).

#### 4.9 Construção das Bibliotecas dos Genes

Para a construção do banco de sequências dos genes de 16S rRNA foi realizada uma clonagem destes genes amplificados a partir do DNA dos micro-organismos do solo. Os fragmentos de DNA purificados foram adicionados a um sistema de ligação com o plasmídeo pCR 2.1 (Invitrogen; ver mapa em ANEXOS) e em seguida transformados em células de *Escherichia coli*, estirpe DH10B eletrocompetentes. A reação de ligação foi feita utilizando-se 50 ng de vetor pCR 2.1, 10 ng de inserto de DNA, 1 unidade de enzima T4 DNA ligase, tampão de reação diluído 10 vezes e água ultra pura estéril para um volume final de 10 µL. O sistema de ligação foi incubado durante a noite em geladeira (aproximadamente 4°C). Técnicas de purificação de plasmídeos em pequena escala, digestão do DNA com endonucleases de restrição, eletroforese em gel de agarose 1%, foram executadas segundo a literatura (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.10 Transformação bacteriana

O método utilizado foi o recomendado pelo fabricante do eletroporador (Gibco-BRL). Brevemente, 1  $\mu\text{L}$  da reação de ligação foi adicionado a 40  $\mu\text{L}$  da solução de bactéria eletrocompetente. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a um campo elétrico (4 $\Omega\text{K}$ , 330  $\mu\text{F}$ ), a fim de permitir a passagem do plasmídeo ao interior na bactéria. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC (composição dos meios de cultura em anexo) e a suspensão foi transferida para um frasco de cultura. Este frasco contendo o meio LB e a bactéria foi incubado sob agitação por uma hora a 37°C. Após esse período a suspensão foi repicada em meio LA, Lisogenic Agar (composição em anexo) com os antibióticos Ampicilina, Kanamicina e com X-gal, numa concentração de 5 mg por placa (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido LA contendo os antibióticos ampicilina e canamicina, além de Xgal como substrato para a enzima  $\beta$ -galactosidase na concentração de 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Como controle foi utilizado o plasmídeo pUC19 (Invitrogen), sendo que uma transformação com 1  $\mu\text{g}$  de plasmídeo produziu  $10^9$  colônias. As colônias transformantes (brancas) foram coletadas e organizadas em placas de Petri contendo meio LA e os antibióticos para o plasmídeo pCR 2.1.

#### 4.11 Preparação dos plasmídeos para sequenciamento

Quanto ao crescimento das bactérias contendo o plasmídeo carregando o gene procedeu-se da seguinte forma: cada poço de um bloco de 96 poços foi preenchido com 1 mL de meio *Terrific Broth* contendo 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Ampicilina (50  $\mu\text{L}$  de ampicilina 100 mg/mL para 50 mL de meio CG). As colônias individuais foram inoculadas com o auxílio de repicadores. Estes

blocos foram incubados a 37 °C, 200 rpm, por 22 horas. Centrifugou-se os blocos por 7 min, 4000 rpm, até sedimentar as células. Adicionou-se a cada poço 180 µL de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L pH 8 e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8 ), a placa foi selada com adesivo e agitada por 2 min para ressuspender as células. Os blocos foram centrifugados por 7 min, 4.000 rpm, até sedimentar as células. Retirou-se o adesivo e descartou-se o sobrenadante. A cada poço 80 µL de GET foram adicionados, contendo 2,5 µL de RNase (10 mg/mL), selou-se a placa com adesivo e agitou-se (Vórtex) por 2 min, para ressuspender as células. Transferiu-se 80 µL da suspensão de células para a microplaca de 250 µL de polipropileno de fundo redondo (Tipo Elisa). A cada poço foram adicionados 80 µL de NaOH 0,2M/ SDS 1%. A solução de lise possui a seguinte composição: 16 ml H<sub>2</sub>O MilliQ, 2 mL de NaOH 2M, 2 mL de SDS 10%. Selou-se bem a placa com o adesivo usado no crescimento e misturou-se 30 vezes por inversão. Adicionou-se a cada poço 80 µL de KOAc 3M (acetato de potássio estocado a 4°C). Pulsou-se até chegar a 4000 rpm. O adesivo foi removido e incubou-se a placa aberta em estufa a 90 °C por 30 min. Seguiu-se com a centrifugação por 10 min., 4000 rpm, a 4 °C. Fixou-se com fita adesiva uma placa *Millipore* (MAGV N22) no topo de uma microplaca de fundo V de 250 µL de polipropileno. O volume do sobrenadante foi transferido para a placa *Millipore*. Removeu-se a placa *Millipore*. Adicionou-se 100 µL de Isopropanol ao filtrado que está na microplaca. Selou-se bem a placa com adesivo (resistente a álcool) e misturou-se 30 vezes por inversão. Em seguida, centrifugou-se por 45 min, 4000 rpm, 20 °C. Adicionou-se 150 µL de etanol 80%. Centrifugou-se por 15 min, 4000 rpm a 20 °C. Removeu-se o sobrenadante conforme anterior. Inverteu-se a placa sobre papel absorvente e pulsa-se, 300rpm, 20 °C. A placa foi seca em temperatura ambiente por 60 min, coberta com papel toalha. Ressuspendeu-se o DNA com 30 µL de água MilliQ. A eletroforese foi feita com 3 µL para averiguar o rendimento.

#### 4.12 Sequenciamento das bibliotecas do gene 16S rRNA

Para cada biblioteca de DNA construída, de uma a duas placas com 96 amostras para cada gene amplificado de 16S rRNA, foi submetida ao sequenciamento. Os genes foram parcialmente seqüenciados a partir da ponta 5'. Foram usados na reação de sequenciamento 5 µL da amostra como preparada no item anterior, adicionando-se 4 µL de ET (Amersham <sup>TM</sup>), 1 µL de *iniciador* (1 pMol) que amplifique no sentido direto ou reverso da fita e colocados em tubos plásticos de reação diferentes para que apenas uma das fitas seja amplificada em cada um dos tubos. A reação de amplificação foi conduzida em termociclador automático Eppendorf MasterCycler Gradiente com o seguinte programa de temperatura: um ciclo inicial de fusão a 94 °C por 4 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 93 °C por 20s, anelamento a 60 °C por 2 min. Este produto de sequenciamento foi precipitado com etanol absoluto e acetato de amônio (2 M), seguido de centrifugação por 10 minutos, uma lavagem do material com etanol 70%, secagem bomba a vácuo. Posteriormente este material foi conduzido ao sequenciador automático ABI 377.

#### 4.13 Análise das sequências

A sequência de bases de cada leitura de sequência de DNA foi determinada a partir dos cromatogramas e as extremidades podadas, em função da qualidade (com a opção “-trim\_alt”), utilizando o programa PHRED (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998). As sequências foram em seguida analisadas quanto a presença de vetor pCR 2.1 (usado nas etapas de

clonagem) utilizando o programa CROSS\_MATCH ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)). As sequências contíguas obtidas foram editadas, mantendo-se somente as regiões delimitadas pelos oligonucleotídeos iniciadores usados no sequenciamento. As sequências de 16S rDNA editadas foram inicialmente submetidas a identificação taxonômica por busca de similaridade com o programa CLASSIFIER (WANG et al., 2007), disponível no sítio do RDP II em [rdp.cme.msu.edu/](http://rdp.cme.msu.edu/). Um valor limite de 50% de confiança para a determinação taxonômica foi usado para sequências com comprimento entre 50 e 250 pb e um valor limite de 80% para sequências com comprimento maior que 250 pb.

Para as análises de busca por similaridade usando bancos de dados, o programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997) ou MegaBLAST (ZHANG et al., 2000) foi usado com o padrão de parâmetros usados pelo programa e fazendo a comparação contra o banco de dados “nr” do GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

As análises envolvendo busca por quimeras, alinhamento de sequências, inferência de riqueza e comparação de bibliotecas foi feita utilizando o programa Mothur, versão 1.9.0 (SCHLOSS et al., 2009). Inicialmente, um alinhamento foi gerado com o programa NAST (DeSANTIS et al., 2006), utilizando como referência o banco de dados SILVA (PRUESSE et al., 2007). O programa NAST usa informação da estrutura secundária da molécula de 16S rRNA para realizar o alinhamento. Para o cálculo das distâncias genéticas foi utilizado o programa DNADIST do pacote PHYLIP (FELSENSTEIN, 2005) aplicando-se a equação de Jukes & Cantor (JUKES E CANTOR, 1969).

Para o cálculo da riqueza compartilhada pelas amostras, os seguintes estimadores foram usados, a partir de uma definição de OTU com 3% de distância genética: riqueza compartilhada estimada por Chao1, riqueza

compartilhada estimada por ACE, coeficiente de similaridade de Jaccard baseado em abundância, coeficiente de similaridade de Sorenson baseado em abundância, coeficiente de similaridade de Jaccard tradicional baseado na riqueza observada, coeficiente de similaridade de Sorenson baseado na riqueza observada, coeficiente de similaridade Jaccard baseado na riqueza estimada por Chao1, coeficiente de similaridade baseado na riqueza estimada por Chao1 (CHAO, 1984; CHAO, 1992; JACCARD, 1908; COWELL et al., 2004).

Cálculos de índices e estimadores de riqueza e diversidade foram aplicados também usando a definição de OTU com 3% de distância genética. Para as análises de riqueza de comunidades, os estimadores Chao1, Jakknife e Bootstrap foram usados. Estes estimadores procuram analisar a riqueza de comunidades bacterianas nas amostras ou bibliotecas. O índice Shannon foi usado como um indicador da diversidade de comunidades. Os índices Boneh e Efron foram usados para estimar o número adicional de OTUs que seria obtido a partir de uma amostragem extra (CHAO, 1984; CHAO, 1992; SHANNON e WEAVER, 1949; SMITH & VAN BELLE, 1984; BONEH et al., 1998; EFRON, 1982).

Para estimativa do número de OTU presentes nas amostras, curvas de rarefação foram geradas a partir de distâncias genéticas de 3% e 20%. Comparações na composição de OTU entre as amostras utilizaram distâncias genéticas de 3%. Os testes de hipóteses foram realizados pelos métodos de LIBSHUFF (que utiliza a estatística de Cramer-von Mises), análise de parcimônia e análise de UniFrac, a partir de um definição de OTU com distâncias genéticas de 3%.

Todas as sequências obtidas neste trabalho, com comprimento maior que 50 pb, foram depositadas no banco de dados *GenBank*

([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sob os números de acesso de HQD18044 a HQD18581.



## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Amostragem das plantas e análise do solo

O solo aderido às raízes de plantas de cana-de-açúcar, com e sem adubação nitrogenada, foi amostrado de acordo com a TABELA 3 e usado para extração de DNA como detalhado no Material e Métodos. Para cada ponto de amostragem, à exceção da amostra chamada "Controle", as plantas de cana-de-açúcar foram coletadas de cada um dos tratamentos: com adubação nitrogenada (N+) e sem adubação nitrogenada (N-).

O solo utilizado para este trabalho possui uma constituição arenosa e pode ser considerado homogêneo, tendo sido utilizado somente para o cultivo de cana-de-açúcar. Mesmo para as áreas sob diferentes tratamentos, não houve mudança significativa nas propriedades químicas do solo ao longo do experimento, como pode ser observado na TABELA 4 que mostra a análise química do solo. Fatores físico-químicos do solo podem influenciar a diversidade de microrganismos (FAORO et al., 2010; FIERER & JACKSON, 2006) e para avaliar se a homogeneidade do solo observada nas amostras se reflete também na diversidade de grupos de bactérias, inicialmente as amostras foram submetidas a análise de ARDRA da comunidade de bactérias. Os resultados mostrados para as análises de ARDRA confirmam esta homogeneidade e indicam que existe uma comunidade de bactérias estável no solo, com grande capacidade resiliente, não sofrendo grandes alterações com o tratamento de adubos nem com mudanças climáticas ao longo do ano. Entretanto, esta análise permite somente comparar grupos taxonômicos mais elevados não indicando, por exemplo, se há diferenças em níveis taxonômicos mais baixos, como para gêneros e espécies.

*TABELA 3. Identificação das amostras analisadas.*

Idade das plantas (em meses)	Data da amostragem	Identificação da amostragem
0	26/09/2006	Controle (Inicial)
2	17/11/2006	1
4	20/01/2007	2
6	08/03/2007	3
8	08/05/2007	4
9	27/06/2007	5
11	28/08/2007	6
13	18/10/2007	7

**TABELA 4. Composição química das amostras do solo aderido às raízes das amostras de plantas de cana-de-açúcar<sup>1</sup>.**

Amostra	pH	pH	Al <sup>+3</sup>	H <sup>+</sup> + Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	SB	T	P	C	V	m	Ca/Mg
	CaCl <sub>2</sub>	SMP	cmolc/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>	%	%	
06/09/2006 (CONTROLE)	5,2	7	7	2,4	1	0,5	0,14	1,64	4,04	12,4	7,8	41	0	2
11/17/2006 (N+)	4,9	6,9	0,1	2,5	1,1	0,3	0,11	1,51	4,01	65,1	6,9	38	6	3,67
11/17/2006 (N-)	5,1	6,9	0	2,5	2,1	0,5	0,23	2,83	5,33	132	7,8	53	0	4,2
01/20/2007 (N+)	4,7	6,8	0,2	2,7	1,1	0,4	0,13	1,63	4,33	97,4	11,5	38	11	2,75
01/20/2007 (N-)	5,4	7	0	2,4	1,2	0,5	0,06	1,76	4,16	23,6	9,6	42	0	2,4
03/08/2007 (N+)	4,6	6,9	0,2	2,5	1	0,3	0,05	1,35	3,85	17,3	11,5	35	13	3,33
03/08/2007 (N-)	4,6	6,9	0,2	2,5	1	0,2	0,15	1,35	3,85	11,4	10,5	35	13	5
05/08/2007 (N+)	4,6	6,9	0,2	2,5	1	0,3	0,06	1,36	3,86	4,6	10,5	35	13	3,33
05/08/2007S/N	4,9	7	0,1	2,4	1	0,4	0,06	1,46	3,86	4,8	9,6	38	6	2,5
06/27/2007C/N	4,9	6,9	0,1	2,5	1	0,3	0,18	1,48	3,98	12,8	8,7	37	6	3,33
06/27/2007S/N	5	7	0	2,4	1	0,3	0,19	1,49	3,89	13,9	7,8	38	0	3,33
08/28/2007C/N	5,4	7,1	0	2,2	1,1	0,7	0,35	2,15	4,35	32,1	13,3	49	0	1,57
08/28/2007S/N	5,8	7,2	0	2	1,1	0,7	0,4	2,2	4,2	28,5	13,3	52	0	1,57
10/18/2007C/N	5,2	6,9	0	2,5	1	0,7	0,21	1,91	4,41	35,9	9,6	43	0	1,43
10/18/2007S/N	5,3	7,1	0	2,2	1,2	0,6	0,21	2,01	4,21	30,7	6,9	48	0	2

<sup>1</sup>O parecer original emitido pelo laboratório de análise encontra-se no item ANEXOS.

## 5.2 Análise de ARDRA e RFLP dos genes *nifH* e *nirK*

Perfis de ARDRA foram obtidos para todas as amostras coletadas, utilizando-se 4 enzimas de restrição, e são mostrados na FIGURA 2. A análise visual dos perfis de ARDRA não mostrou mudança perceptível na estrutura da comunidade bacteriana quando comparadas as amostras de solo aderido à raiz dos tratamentos fertilizado e não-fertilizado. Estes dados sugerem que, de forma geral e para grandes grupos taxonômicos, a comunidade bacteriana se manteve estável ao longo dos 13 meses de acompanhamento. Mesmo as amostras tardias mostraram grande semelhança no perfil de restrição com a amostra inicial. Também não foi observado diferença nas amostras que receberam adubação nitrogenada quando comparadas às amostras que não receberam adubação. Entretanto, a análise de ARDRA exibe um padrão complexo (OSBORN, 2005) e possui uma baixa resolução e poderia revelar apenas mudanças de *taxa* de níveis superiores (ex., Filo). Contudo, a análise de Agrupamento sugere uma separação entre as amostras de solo de plantas jovens, amostras inicial e de 2 a 4 meses, das plantas mais velhas, amostras de 6 a 13 meses (FIGURA 7). Não foi observada nenhuma separação em relação às amostras que receberam adubação nitrogenada daquelas que não receberam adubação.

Idealmente, um número maior de amostras, contendo repetições, é necessário para cobrir a possível variabilidade espacial no solo. Entretanto, a situação não é assim tão problemática, uma vez que a comunidade microbiana do solo (ao menos os organismos dominantes) parecem em alguns casos ser surpreendentemente constantes (FELSKE & OSBORN, 2005). Alguns trabalhos mostram que uma amostra de solo de 1g é representativa para um solo homogêneo de centenas de metros quadrados, havendo similaridade entre as comunidade mesmo em pontos distantes (FELSKE & AKKERMANS, 1998). Resultados para análise de padrões de bandejamento do DNA a partir de diferentes amostras do mesmo ponto foram quase idênticos. A similaridade para padrões de bandejamento do DNA usando o 16S rDNA como marcador

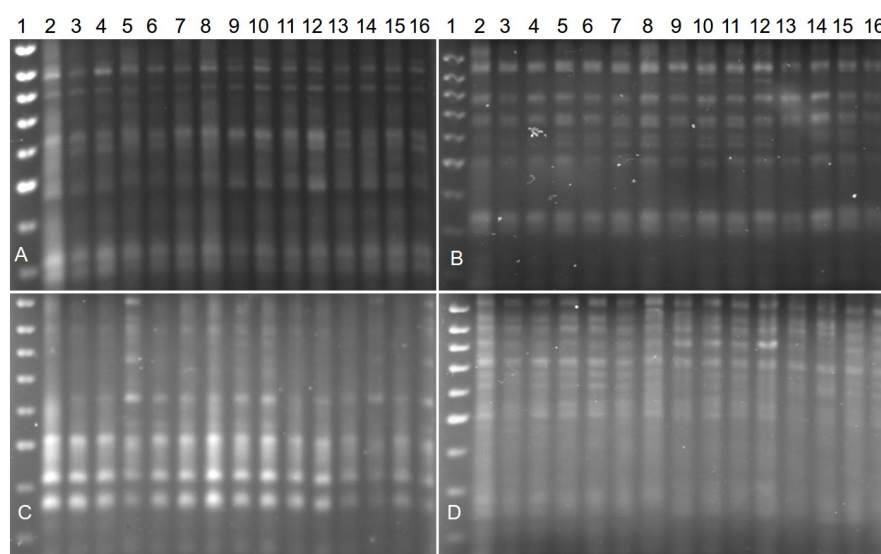
entre diferentes pontos de amostragem indicaram que, mesmo para longas distâncias, alterações espaciais da comunidade de bactérias pode não ser dramática, através de um histórico agrícola heterogêneo. Consequentemente, uma similaridade substancial na composição das comunidades bacterianas nos solos pode ser esperada, mesmo em uma escala de quilômetros. Entretanto, estas similaridades parecem ser definidas pelo tipo de solo, com comunidades de bactérias em diferentes tipos de solos mostrando variação (GIRVAN et al., 2003; BUCKLEY & SCHMIDT, 2001). Os resultados obtidos para as análises químicas das amostras de solo e para as análises de ARDRA da comunidade de bactérias presentes nas amostras confirmaram esta homogeneidade, pelo menos entre grupos taxonômicos elevados (ex., filos). Uma marcante estabilidade na diversidade de filos é esperada no solo, mas uma alta diversidade ocorre em nível de ordem, família, gênero e espécie (FULTHORPE et al., 2008; SPAIN et al., 2009).

Para avaliar se comunidades de grupos funcionais de bactérias também permaneceram homogêneos ao longo do tempo e com a adubação nitrogenada, a análise de perfil de restrição foi também realizada a partir de genes funcionais que possuem um papel importante no ciclo do nitrogênio. O gene *nirK* codifica para uma enzima nitrito redutase contendo cobre e está envolvido na redução de nitrito a amônia. O gene *nifH* codifica para a proteína ferro nitrogenase ou nitrogenase redutase e faz parte do complexo da nitrogenase, responsável pela Fixação Biológica de Nitrogênio, reduzindo nitrogênio molecular a amônia. Para esta análise, amostras de três diferentes tempos foram selecionadas (inicial, 8 meses e 13 meses). Para os tempos de 8 e 13 meses as amostras com e sem adubação nitrogenada também foram analisadas.

Os resultados obtidos para as análise de RFLP do gene *nifH* mostraram padrões complexos (dados não mostrados) mas, de modo geral e diferentemente do que foi observado para a análise de ARDRA, é possível observar uma maior proximidade das amostras que receberam adubação nitrogenada daquelas que não receberam adubação na análise de agrupamento (FIGURA 8).

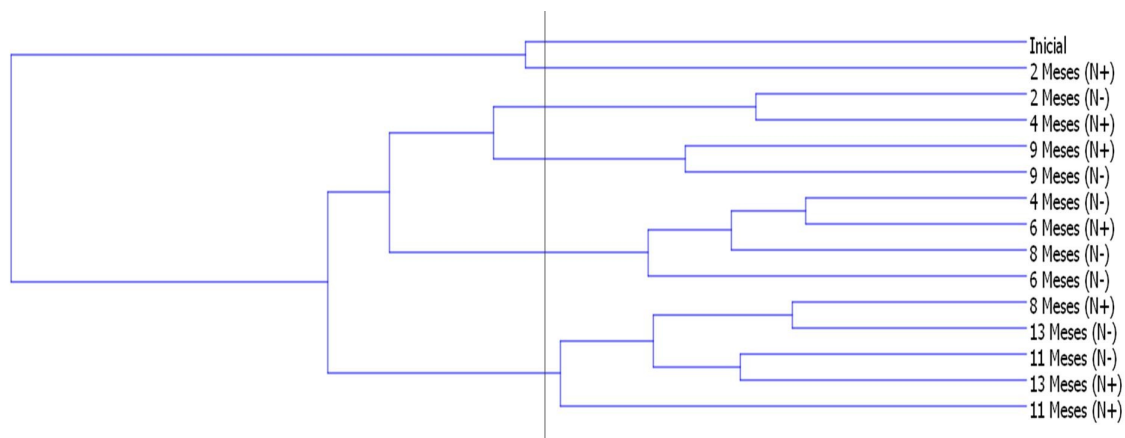
Para o gene *nirK* (FIGURA 9), novamente foi observado um agrupamento em relação à idade das amostras e independente da adubação nitrogenada. A amostra inicial forma um grupo separado das demais amostras e é possível observar que as amostras de 8 meses apresentam uma distância menor entre a amostra adubada em relação a não adubada do que a distância das amostras de 13 meses. Este resultado sugere que a comunidade de organismos responsáveis pela redução de nitrito sofreu alteração ao longo do tempo. Entretanto, a análise de amostras em períodos intermediários seria necessário para confirmar estes dados.

As alterações na comunidade de grupos de organismos funcionais específicos, envolvidos no ciclo do nitrogênio também sugere que a disponibilidade deste nutriente no solo possa ter variado ao longo do experimento.



**FIGURA 6.** Padrões de ARDRA para amostras de solo aderido à raiz de cana-de-açúcar.

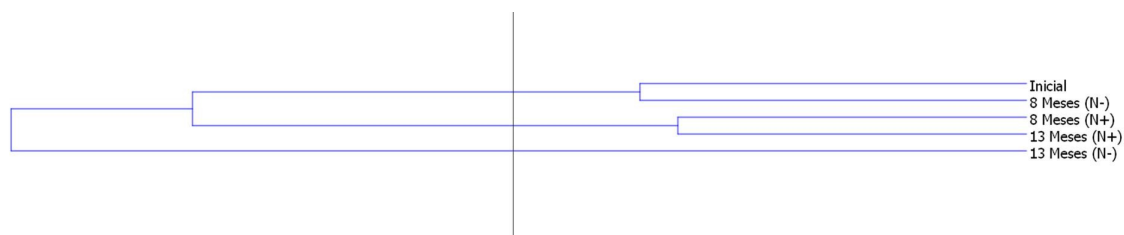
Cada amostra foi usada para restrição com as enzimas *HaeIII* (A); *HinfI* (B); *RsaI* (C); e *Sau3AI* (D). As amostras contidas nos poços são: 1. marcador molecular de 100 pb (Invitrogen); 2. 26/09/2007 (inicial); 3. 17/11/2006 (2 meses) (N+); 4. 17/11/2006 (2 meses) (N-); 5. 20/01/2007 (4 meses) (N+); 6. 20/01/2007 (4 meses) (N-); 7. 08/03/2007 (6 meses) (N+); 8. 08/03/2007 (6 meses) (N-); 9. 08/05/2007 (8 meses) (N+); 10. 08/05/2007 (8 meses) (N-); 11. 27/06/2007 (9 meses) (N+); 12. 27/06/2007 (9 meses) (N-); 13. 28/08/2007 (11 meses) (N+); 14. 28/08/2007 (11 meses) (N-); 15. 18/10/2007 (13 meses) (N+); 16. 18/10/2007 (13 meses) (N-).



**FIGURA 7.** *Análise de agrupamento hierárquico a partir dos resultados de ARDRA para as amostras de solo aderido à raiz de cana-de-açúcar.*

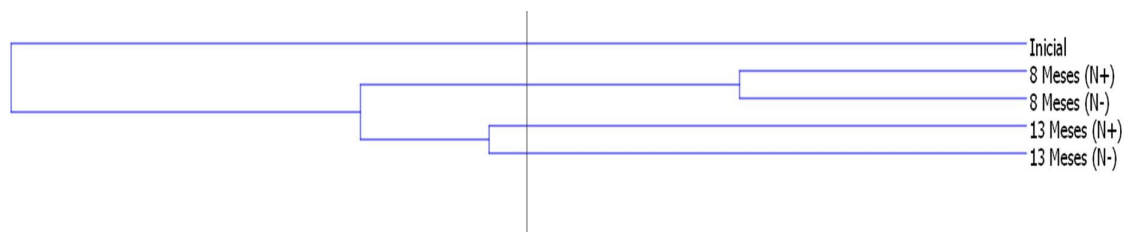
A análise foi realizada para o conjunto de quatro enzimas de restrição (*HaeIII*, *HinfI*, *RsaI* e *Sau3AI*) utilizando a correlação de Pearson para o cálculo das distâncias e o método de Agrupamento Hierárquico UPGMA para construção do dendrograma. A linha vertical representa uma *diferença* de 25% entre os agrupamentos.





**FIGURA 8.** *Análise de agrupamento hierárquico a partir dos resultados de RFLP do gene nifH para 5 amostras de solo aderido à raiz de cana-de-açúcar.*

A análise foi realizada para o conjunto de três enzimas de restrição (*AluI*, *HaeIII* e *RsaI*) utilizando a correlação de Pearson para o cálculo das distâncias e o método de Agrupamento Hierárquico UPGMA para construção do dendrograma. A linha vertical representa uma diferença de 25% entre os agrupamentos.



**FIGURA 9.** *Análise de agrupamento hierárquico a partir dos resultados de RFLP do gene nirK para 5 amostras de solo aderido à raiz de cana-de-açúcar.*

A análise foi realizada para o conjunto de três enzimas de restrição (*AluI*, *HaeIII* e *RsaI*) utilizando a correlação de Pearson para o cálculo das distâncias e o método de Agrupamento Hierárquico UPGMA para construção do dendrograma. A linha vertical representa uma diferença de 25% entre os agrupamentos.

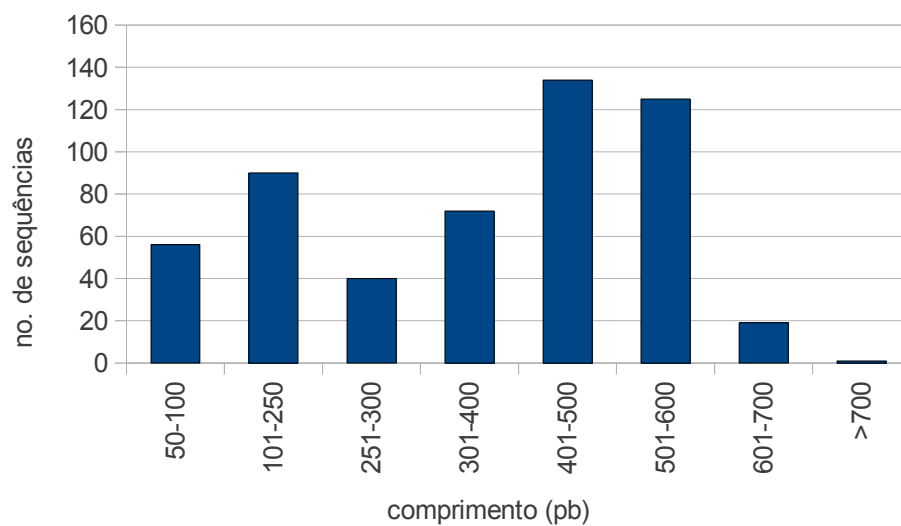
### 5.3 Construção, sequenciamento e análise dos clones das bibliotecas do gene 16S rRNA

A análise da diversidade de comunidades de bactérias a partir de sequências do gene 16S rRNA, independente de cultivo tem se mostrado uma ferramenta poderosa na ecologia de microrganismos e permite a comparação entre comunidades de microrganismos e a identificação, em diferentes níveis taxonômicos, dos indivíduos que compõem estas comunidades. Sendo assim, três amostras foram selecionadas para a construção de bibliotecas e sequenciamento dos clones a partir do fragmento amplificado para o gene 16S rRNA: a amostra “inicial”, que deu origem a biblioteca CONTROLE; a amostra após 13 meses de plantio sem adubação nitrogenada, que deu origem a biblioteca NAOFERT; e a amostra após 13 meses de plantio que recebeu adubação nitrogenada e deu origem a biblioteca FERT. A TABELA 5 mostra o número de sequências obtidas após remoção de bases de baixa qualidade, divididas em cada uma das bibliotecas. A distribuição de comprimentos para as sequências obtidas é mostrada na FIGURA 10. Um número significativo das sequências ficou com um comprimento acima de 250 pb (72,8%) e acima de 500 pb (51,9%). Há um total de 394 sequências maiores que 250 pb, e um total de 151 sequências que possuem um tamanho entre 50 e 250 pb. As sequências com comprimento  $\geq 250$  pb foram também alinhadas contra o 16S rRNA referência de *E. coli* usando a ferramenta de alinhamento disponível no sítio do RDP II (FIGURA 11). Variação na região de cobertura do alinhamento é observada. Entretanto, a maior parte das sequências cobre a região de ~50 pb a ~350 pb, que compreende as regiões variáveis V1 e V2 (BAKER et al., 2003), úteis na análise da diversidade. Este grupo de sequências foi também

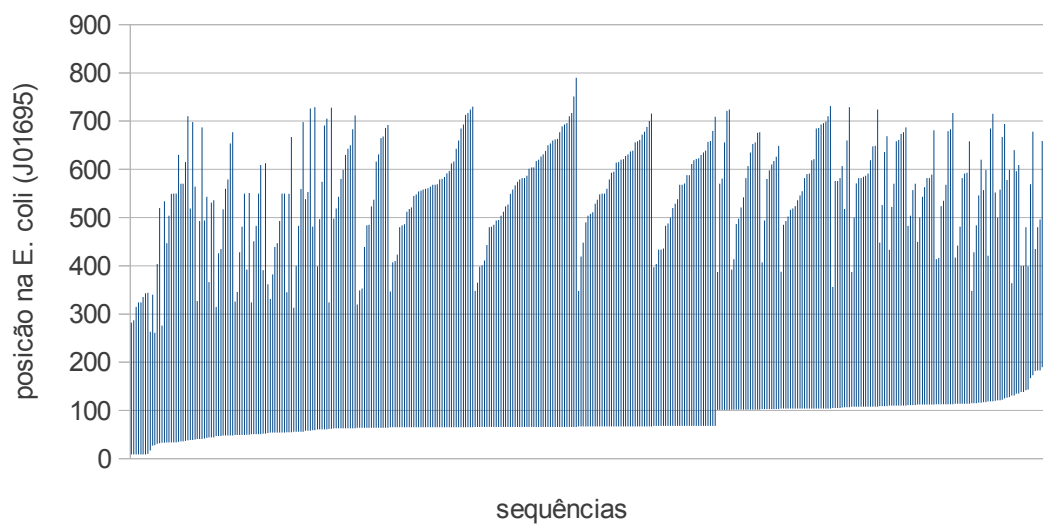
analisado quanto a possível formação de quimeras usando o método de Bellerophon (HUBER et al., 2004) implementado no programa Mothur. Embora parte das sequências tenha apresentado valores de score indicativos de formação de quimeras (dados não mostrados), a análise detalhada destas sequências através de busca por similaridade utilizando o programa BLASTN contra o banco de dados não redundante do GenBank, mostrou que a maior parte destas sequências possui alta identidade e alinha homogeneamente com sequências depositadas no banco de dados, indicando serem sequências representativas de organismos reais, presentes nas comunidades amostradas. Entretanto, o clone R7SP1T1H06 (315 pb) foi identificado como um artefato, sendo composta unicamente por repetições sequenciais do oligonucleotídeo GGATCAACTCTAGAGTTTGATCCTGGCTCA. Parte da sequência é composta pelo oligonucleotídeo iniciador universal 27F, usado para amplificação do gene 16S rRNA a partir do DNA extraído das amostras. É possível que a formação de tal artefato tenha ocorrido a partir de um grampo formado na ponta 5' do oligonucleotídeo iniciador 27F, o que permitiria a extensão consecutiva do oligonucleotídeo iniciador e de fragmentos concatenados por parte da Taq DNA polimerase. Este artefato foi excluído das análises. Embora a identificação de tal artefato possa sugerir uma tendência no processo de amplificação com implicações na representatividade das bibliotecas do gene 16S rRNA, tal anomalia foi verificada somente no clone R7SP1T1H06 e não é possível saber sua influência. Embora outros oligonucleotídeos iniciadores tenham sido desenhados e usados em estudos de diversidade, como por exemplo o 63F (MARCHESI et al., 1998), degenerações e tendências para estes oligonucleotídeos iniciadores também foram observadas (HONGO et al., 2003).

*TABELA 5. Número de clones do gene 16S rRNA sequenciados em cada uma das bibliotecas.*

Amostra	Biblioteca	Número de Sequências		
		≥ 50 pb	≥ 250 pb	Total
Inicial	CONTROLE	70	84	154
13 meses	NAOFERT	17	79	96
13 meses	FERT	60	228	288
Total		147	391	538



**FIGURA 10.** Distribuição dos comprimentos das seqüências do gene 16S rRNA para as bibliotecas CONTROLE, FERT e NAOFERT.



**FIGURA 11.** Alinhamento das sequências das bibliotecas de 16S rDNA com comprimento  $\geq 250$  pb, mostrando a região coberta em relação a sequência parcial do gene 16S rRNA de *E. coli*.

### 5.3.1 Análise baseada na identificação taxonômica dos clones

As sequências das três bibliotecas, FERT (que recebeu fertilizante nitrogenado), NAOFERT (onde não houve adição de fertilizante nitrogenado) e CONTROLE foram submetidas a identificação taxonômica pelo programa CLASSIFIER (Wang et al., 2007). As sequências foram separadas em dois grupos para a identificação taxonômica:  $\geq 50$  pb e  $\geq 250$  pb.

A separação foi necessária porque para a identificação taxonômica usando o programa CLASSIFIER é recomendado um valor de corte de 50% para o limite de confiança da análise para sequências com um tamanho entre 50 e 250 pb e um valor de corte de 80% para o limite de confiança para sequências  $\geq 250$  pb. Valores diferentes, são indicados nas tabelas e figuras para as respectivas análises.

Os limites utilizados garantem uma acurácia suficiente para se atingir a classificação no nível genérico (CLAESSON, 2009).

A FIGURA 12 mostra a distribuição taxonômica das sequências analisadas em relação à proporção dos filos predominantes, presentes nas três amostras e a diversidade total. É possível observar que, de forma geral, as amostras possuem uma distribuição de filos semelhante, com algumas variações, possivelmente em função do número diferente de clones em cada biblioteca.

Estes dados confirmam os resultados obtidos para as análises de ARDRA, mostrando que não há grandes diferenças entre as comunidades em níveis taxonômicos mais altos.



As sequências que não puderam ter a identificação taxonômica resolvida em nenhum nível dentro do domínio Bactéria (*unclassified*, FIGURA 12), contaram com 13,6% do total.

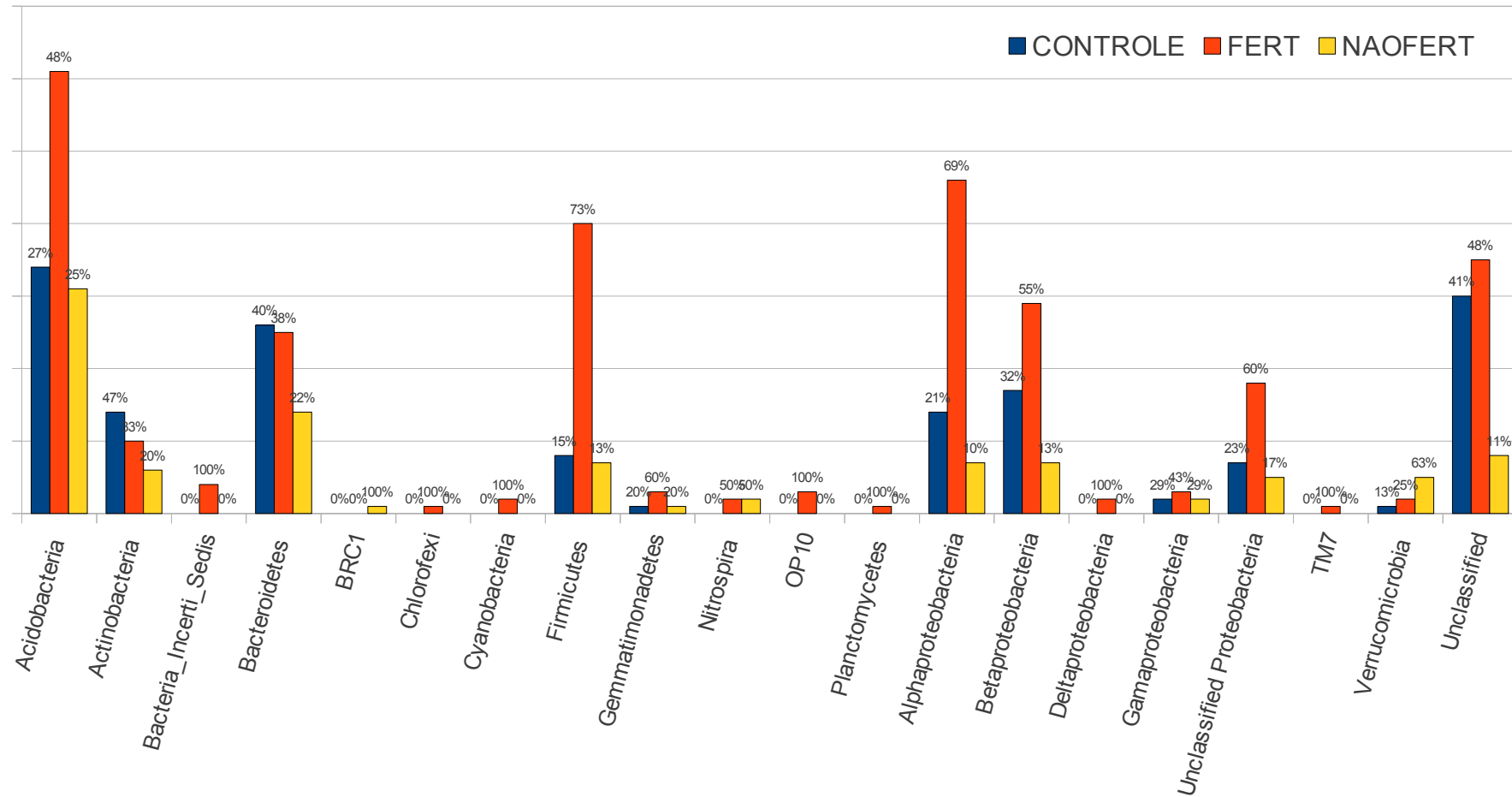
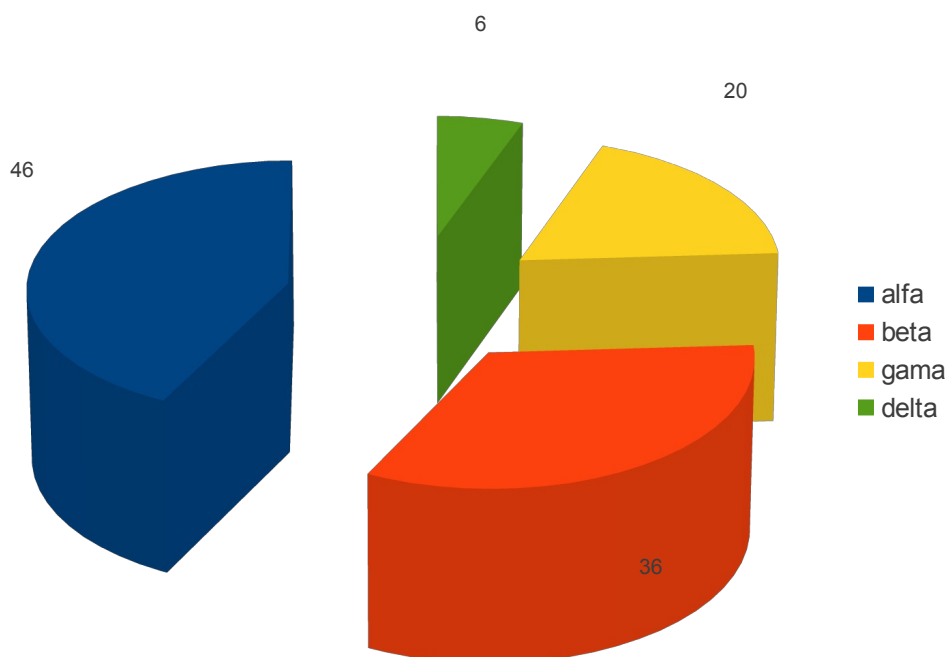


FIGURA 12. Distribuição dos filos predominantes para as bibliotecas do gene 16S rRNA de amostras de solo aderido a raiz de cana-de-açúcar. Foram consideradas na análise sequências com comprimento  $\geq 50$  pb.



*FIGURA 13. Distribuição das sequências do conjunto das amostras CONTROLE, FERT e NAOFERT no filo Proteobacteria. Foram consideradas somente sequências  $\geq 250$  pb; total de 108 sequências identificadas no filo Proteobactéria através do programa CLASSIFIER do RDP II, usando um valor de corte para o limite de confiança de 80%.*

Os filos bacterianos que aparecem em maior proporção nas bibliotecas são: Acidobactéria (23,4%), Bacteroidetes (12,1%), Firmicutes (10,2%), Actinobacteria (5,6%), e as Proteobactérias (24,0%). Em relação ao filo das Proteobactérias, as classes Alfaproteobactérias (12,4%) e Betaproteobactérias (9,8%) estão mais representadas, seguidas por somente alguns poucos representantes das classes Gamaproteobactérias (1,3%) e Deltaproteobactérias (0,4%) (FIGURA 13). Os filos Acidobactéria e Proteobactéria foram também observados como sendo os grupos predominantes em amostras de organossolos no Paraná, com pH entre 3,2 e 4,0 (ETTO et al., dados não publicados) e em solo de Floresta Atlântica no Paraná, com pH entre 3,7 e 4,4 (FAORO et al., 2010). Em organossolos, a predominância de um ou outro filo depende da amostra e em solo de Mata Atlântica, Proteobactérias parece ser o filo predominante com 64% do total. Spain e colaboradores compararam a abundância relativa de Proteobactérias em diferentes solos, observando uma variação de 25% (solo de pradaria – EUA) a 50% (solo agrícola com plantação de milho – Brasil) do total de sequências analisadas (SPAIN et al., 2008). A proporção de 24,0% encontrada para o conjunto das amostras de solo aderido à raiz de cana-de-açúcar está bem abaixo do valor obtido para as amostras de solo brasileiro analisado e próximo do observado para o solo de pradaria nos EUA. O valor fica também distante daquele obtido para amostra de solo sob cultivo de cana-de-açúcar nos EUA, que foi de 48% (SPAIN et al., 2008).

Alguns filos aparecem exclusivamente em apenas uma das bibliotecas, como é o caso do filo BCR1 (1 clone), com representante apenas na biblioteca NAOFERT. A biblioteca FERT apresenta o maior número de Filos únicos: Chlorofexi (1 clone), Cyanobacteria (2 clones), OP10 (3 clones), Planctomycetes (1 clone) e TM7 (1 clone), além de representantes exclusivos da classe Deltaproteobactéria (2 clones). Entretanto, é necessário considerar que, para estes casos, somente alguns poucos clones foram identificados e, na sua grande maioria, na biblioteca com o maior número de clones sequenciados (FERT).

Sequências com comprimento  $\geq 250$  pb permitiram uma classificação em níveis taxonômicos mais baixos, com um maior grau de confiabilidade. A distribuição destas sequências classificadas nos principais níveis taxonômicos é mostrada na TABELA 6. Uma pequena variação foi observada no número de sequências classificadas em níveis taxonômicos mais altos, como filos, quando se aplicou diferentes valores de corte para o limite de confiança no programa CLASSIFIER (TABELA 6). Entretanto, uma maior variação ocorreu em níveis taxonômicos mais baixos, como gêneros. Não foi observado variação substancial nas proporções dos grupos taxonômicos mais altos, como filos, em relação a classificação feita com todas as sequências com comprimento  $\geq 50$  pb. Considerando o valor de corte de 80% para o limite de confiança, verificase que 90% das sequências puderam ser classificadas dentro dos 16 filos identificados, mas somente 32,6% das sequências foram classificadas até gênero.

O número de clones identificados para cada gênero é mostrada na TABELA 7 e detalhes do resultado da classificação pelo programa CLASSIFIER é mostrada em uma tabela no item ANEXOS. Diferentes gêneros, da classe das Alfabroteobactérias, contendo bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular leguminosas foram encontrados (AMADOU et al., 2008): *Bradyrhizobium* (3 clones), *Mesorhizobium* (2 clones), *Rhizobium* (2 clones) e *Azospirillum* (1 clone). Também foram identificados 6 clones como pertencentes ao gênero *Burkholderia*, que possui diversas espécies capazes de fixar nitrogênio e frequentemente são isoladas em associação com diversas gramíneas, inclusive a cana-de-açúcar.

Para investigar em mais detalhes a classificação destes clones, as sequências foram extraídas e utilizadas em uma busca de similaridade com o programa MEGA-BLAST contra o banco de dados não redundante do GenBank. O gênero *Bacillus* (filo Firmicutes) foi o predominante, representando 19,7% das sequências classificadas até gênero e foi investigado em maiores detalhes. Uma alta identidade, variando de 98% a 100% foi obtida com sequências presentes no banco de dados, de isolados de *Bacillus* de solos contaminados e agrícolas. O clone N-P1R1B08 mostrou 97% de identidade

com sequência de *Bacillus* não cultivado de sedimento marinho. *B. megaterium*, *B. asahii*, *B. bataviensis* e *B. aryabhattai* foram as espécies mais próximas encontradas.

Para as sequências relacionadas a *Burkholderia*, alta identidade, variando de 97% a 99%, foi obtida com sequências de estirpes isoladas principalmente de solos agrícolas e em associação com plantas, confirmando que os clones obtidos referem-se a sequências de organismos com potencial para associação e promoção de crescimento de plantas. Também foi observado o mesmo resultado geral para sequências identificadas como *Azospirillum* e rizóbios (TABELA 8). Quatro clones foram identificados como pertencentes ao gênero *Nitrospira*, com representantes capazes de oxidar amônia, mas as sequências mais próximas no banco de dados foram para clones não cultivados. Entretanto, identidade de 90% a 94% com *N. muscoviensis* e *Candidate N. bockiana* foi também observada, o que não permite inferência sobre as espécies.

**TABELA 6.** Identificação dos grupos taxonômicos no CLASSIFIER RDP II para o conjunto das sequências das amostras CONTROLE, FERT e NAOFERT.

Grupo taxonômico	<i>Bootstrap cutoff</i>		
	100%	98%	80%
Filo	300 (76,3%) <sup>a</sup>	323 (82,2%)	354 (90,0%)
Classe	277 (70,5%)	305 (77,6%)	345 (87,8%)
Ordem	247 (62,8%)	275 (70,0%)	312 (79,4%)
Família	118 (30,0%)	145 (36,9%)	184 (46,8%)
Gênero	50 (12,7%)	71 (18,1%)	128 (32,6%)

Foram consideradas somente sequências com comprimento  $\geq 250$  pb; entre parênteses, a porcentagem em relação ao total de sequências analisadas (393).

TABELA 7. Identificação até gênero para clones das bibliotecas do gene 16S rRNA de amostras de solo aderido à raiz de cana-de-açúcar.

Filo/Classe <sup>1</sup>	Gênero	No. de clones
Actinobacteria	<i>Dactylosporangium</i>	1
	<i>Lechevalieria</i>	2
	<i>Mycobacterium</i>	1
	<i>Nocardioides</i>	1
	<i>Rubrobacter</i>	1
	<i>Sinomonas</i>	1
	<i>Streptomyces</i>	1
	SUBTOTAL	8
Bacteroidetes	<i>Ktedonobacter</i>	4
	<i>Chitinophaga</i>	1
	<i>Chryseobacterium</i>	1
	<i>Ferruginibacter</i>	1
	<i>Flavisolibacter</i>	4
	<i>Flavobacterium</i>	1
	<i>Mucilaginibacter</i>	6
	<i>Niastella</i>	8
	<i>Terrimonas</i>	9
	SUBTOTAL	35
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	25
	<i>Cohnella</i>	2
	<i>Paenibacillus</i>	4
	<i>Tumebacillus</i>	2
	SUBTOTAL	33
Gemmatimonadetes	<i>Gematimonas</i>	5
	SUBTOTAL	5
Nitrospira	<i>Nitrospira</i>	4
	SUBTOTAL	4

continua



Filo/Classe <sup>1</sup>	Gênero	No. de clones
		continuação
	<i>Azospirillum</i>	1
	<i>Belnapia</i>	2
	<i>Bradyrhizobium</i>	3
	<i>Hyphomicrobium</i>	1
	<i>Labrys</i>	1
Alphaproteobacteria	<i>Mesorhizobium</i>	2
	<i>Methylobacterium</i>	1
	<i>Novosphingobium</i>	1
	<i>Pseudolabrys</i>	1
	<i>Rhizobium</i>	2
	<i>Rhodoplanes</i>	3
	<i>Burkholderia</i>	6
	<i>Cupriavidus</i>	1
	<i>Massilia</i>	5
Betaproteobacteria	<i>Methylibium</i>	2
	<i>Ralstonia</i>	1
	<i>Ramlibacter</i>	1
	<i>Variovorax</i>	2
Gammaproteobacteria	<i>Steroidobacter</i>	2
	<i>Anaeromyxobacter</i>	2
Deltaproteobacteria	<i>Bdellovibrio</i>	2
	SUBTOTAL	42
	TOTAL	127

<sup>1</sup>Classes são mostradas somente dentro do filo Proteobacteria.

**TABELA 8. Resultados para busca com o programa MEGA-BLAST para clones identificados como bactérias simbióticas/associativas.**

Clone	Espécie <sup>1</sup>	Fonte	Fonte geográfica	Identidade (%) <sup>2</sup>
Clones matching <i>Burkholderia</i> genus				
N+P7R2A11	Uncultivated <i>Burkholderia</i>	Solo agrícola	EUA	97
	<i>Burkholderia</i> strain	Solo de floresta		97
N+P1R1F05		Solo agrícola	Holanda	97
	<i>B. hospita</i> strain	Solo agrícola		97
	<i>Burkholderia</i> strain	<i>Mimosa pudica</i>	Filipinas	97
N+P1R1G07	<i>Burkholderia</i> sp.		China	99
	<i>B. cepacia</i> strain	Caule de milho (endofítico)	China	99
N+P3R1F01	<i>Burkholderia</i> sp. strain	<i>Mimosa pudica</i>	Filipinas	97
	<i>Burkholderia</i> sp. strain	<i>Mimosa pigra</i>	Costa Rica	97
N+P3R1G05	<i>B. caribensis</i>	Solo	México	99
	<i>B. caribensis</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i>	Brazil (Amazônia)	99
N-P1R2G03	<i>Burkholderia</i> sp.	Rizosfera de tomate	México	98
	<i>B. caribensis</i>	Solo		98
Clones matching <i>Azospirillum</i> genus				
N+P8R1H01	<i>A. brasilense</i> strain	<i>Triticum aestivum</i>	Grécia	96
Clones matching <i>Bradyrhizobium</i> genus				
N+P7R2F05	Uncultured alpha proteobacterium clone	Amostra gastrointestinal humana preservada		99
	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. Y	<i>Indigofera linifolia</i> (nódulo de raiz)	Austrália	99
N+P8R1G06	<i>B. japonicum</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	China	98
N+P8R2C05	Uncultured bacterium clone	Pele de antebraço humana		100
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine soja</i>		99

continua

Clone	Espécie <sup>1</sup>	Fonte	Fonte geográfica	Identidade (%) <sup>2</sup>
continuação				
Clones matching <i>Mesorhizobium</i> genus				
N+P7R2D05	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	Senegal	99
	<i>M. amorphae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	China	98
N+P7R2F06	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	Senegal	98
	<i>M. amorphae</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Brasil	98
Clones matching <i>Rhizobium</i> genus				
R0SP1T1A05	<i>Rhizobium</i> sp. Strain	Cana-de-açúcar (endofítico)	Brasil	99
	<i>R. tropici</i>	<i>Platycodon grandiflorus</i> (raiz; endofítico)		99
N+P1R1G08	<i>R. multihospitium</i>	<i>Cytisus striatus</i> (raiz; endofítico)	Espanha	99

<sup>1</sup>Espécie identificada pelos melhores resultados da pesquisa de similaridade utilizando o algoritmo MEGA-BLAST contra o banco de dados de nucleotídeos do GenBank.

<sup>2</sup>Porcentagem de identidade de bases para o alinhamento; o valor E para todas as comparações foi igual a 0.0.

Os resultados obtidos são consistentes com classes de Proteobactérias encontradas em outros estudos de diversidade de solos (SPAIN et al., 2009) e também com filos e classe de Proteobactérias encontrados regularmente no Brasil (ROESCH et al., 2007; FULTHORPE et al., 2008). Ainda assim, alguns dos filos bacterianos já encontrados e descritos em solos agrícolas brasileiros não foram observados neste trabalho, tais como *Deferribacteries* e *Fusobacteria*. Este fato pode ser explicado pelo número de sequências analisados em cada uma das bibliotecas ser reduzido quando comparados aos trabalhos anteriormente citados, sendo que o número de sequências estudado em ROESCH et al., 2007 é da ordem de dezenas de milhares de sequências do gene 16S rRNA. Alternativamente, as características químicas e físicas dos solos analisados podem influenciar os grupos de organismos presentes.

As três bibliotecas apresentaram um número baixo de gêneros contendo espécies capazes de colonizar endofiticamente plantas de cana-de-açúcar, o que sugere que o solo pode não ser um repositório para este tipo de bactéria, como a princípio poderia parecer.

Usando-se as mesmas amostras, MAGNANI (2009) mostrou, através de técnica independente de cultivo, que as bactérias predominantes que colonizam a cana-de-açúcar endofiticamente são: *Enterobacter* e *Pseudomonas*, com pouquíssimos representantes de bactérias fixadoras de nitrogênio ou promotoras de crescimento. Estes resultados foram confirmados usando amostras diferentes de plantas de cana-de-açúcar e uma abordagem dependente de cultivo (MAGNANI et al., 2010).

SUMAN et al., (2001) mostraram que bactérias fixadoras de nitrogênio constituem uma pequena parte das bactérias endofíticas, variando de 0,02% a 3,86% das bactérias da comunidade.

Contudo, entre bactérias diazotróficas endofíticas, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Ideonella* foram observados em grande quantidade no caule do milho e parece ter um papel importante no metabolismo de nitrogênio desta planta (ROESCH et al., 2008). Já foi sugerido que as práticas agrícolas

influenciam significativamente a diversidade de bactérias (ROESCH et al., 2007).

### 5.3.2 Análise baseada em OTU

#### 5.3.2.1 Estimativas de riqueza e índices de diversidade

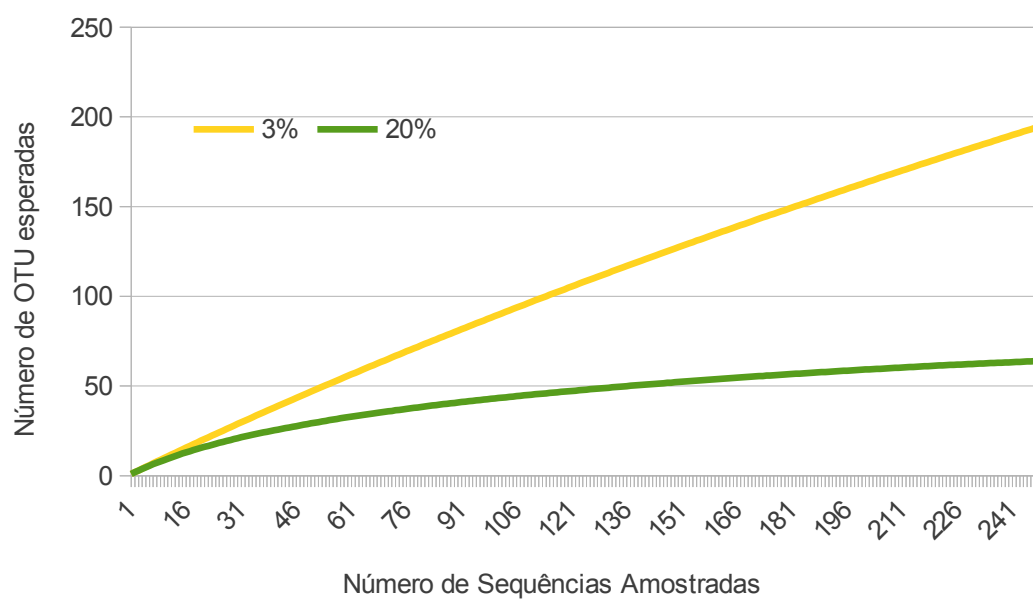
Uma vez que o número de sequências obtidas para cada biblioteca foi bastante variável, para realizar as análises comparativas de diversidade entre as amostras, foram antes retiradas aleatoriamente 143 sequências da amostra FERT, afim de manter o número de sequência nas amostras mais próximos. Portanto, as análises comparativas para a diversidade foram feitas com o seguinte número de sequências para as bibliotecas: FERT, 86 sequências; NAOFERT, 78 sequências e; CONTROLE, 86 sequências. Totalizando 250 sequências analisadas.

A estimativa do valor máximo de OTUs em um nível filogenético arbitrário pode ser feita utilizando métodos estatísticos capazes de extrapolar a relação de OTUs em função do número de sequências a partir da curva de rarefação ou de métodos não-paramétricos. A curva de rarefação pode ser usada como indicativo da diversidade da comunidade e também da cobertura desta diversidade obtida através do esforço amostral.

Para se estimar a riqueza de OTU e obter indicação acerca da representatividade das amostras de solo, a riqueza de filotipos foi verificada por meio do método de rarefação a 20% e 3% de dissimilaridade. Estes valores são comumente usados na literatura como valores limites para diferenciação entre filos e espécies, respectivamente (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005).

As curvas de rarefação resultantes, para cada amostra individualmente, foram ascendentes e muito próximas, não atingindo o platô quando uma dissimilaridade de 3% foi usada como critério de OTU (dado não mostrado). O mesmo se verificou para a curva de rarefação aplicada ao conjunto de dados das três amostras (FIGURA 14), indicando que o número de sequências 16S rRNA não amostrou completamente a riqueza de filotipos das comunidades bacterianas em nível de espécies. Este resultado era esperado

em função da grande diversidade de bactérias presente em amostras de solo (RÖSCH et al., 2007). Por outro lado, a curva de rarefação obtida a partir de uma dissimilaridade de 20% como critério de OTU atingiu o platô, indicando uma saturação dos filos no conjunto das amostras (FIGURA 14).



**FIGURA 14.** Curva de rarefação para o conjunto das bibliotecas do gene 16S rRNA das amostras CONTROLE, FERT e NAOFERT a 3% e 20% de dissimilaridade.

Portanto, analisando a curva de rarefação nos níveis específicos e de filotipos, acredita-se que o número de grupos filogenéticos seja bem maior nas amostras de solo aderidos às raízes de cana-de-açúcar do que aqueles observados. Por outro lado, de acordo com Spain e colaboradores (SPAIN et al., 2009), considera-se que os solos brasileiros possuam uma diversidade menor de bactérias, quando comparados a solos de outras regiões geográficas do planeta, e atribui-se a isto o fato dos solos brasileiros possuírem valores de pH bem abaixo dos solos das outras regiões, variando de 4,6 a 5,8. Este fator, sozinho, seria capaz de influenciar significativamente a composição da comunidade bacteriana (ROUSK et al., 2010).

As práticas agrícolas também influenciam enormemente a comunidade microbiana do solo. Nos solos onde é comum a prática da agricultura encontra-se uma diversidade muito grande de bactérias em nível de espécies, em contrapartida, em solos de florestas, há uma diversidade maior com relação ao número de filos encontrados e uma diversidade menor de espécies quando compara-se o solo de florestas com o solo agrícola (UPCHURCH et al., 2008; ROESCH, 2007).

Diversas medidas, índices e estimativas foram calculados a partir dos dados observados para as amostras com o objetivo de medir a riqueza presente nas amostras individuais e compartilhadas, estimar a similaridade na estrutura das comunidades e prever a obtenção de novas OTU a partir de um novo esforço amostral. Os valores para os índices e estimadores obtidos são mostrados nas TABELA 9 e 10.

Inicialmente, três métodos foram usados para estimar a riqueza individual das comunidades de bactérias nas amostras. A estimativa de Chao1 é largamente empregada em estudos ecológicos e de diversidade. O método extrapola o número de OTU observadas (Sobs) a partir da relação entre as OTU observadas uma única vez e aquelas



observadas em duplicata. Os valores obtidos para as amostras estimam uma maior riqueza na amostra que recebeu adubação nitrogenada (FERT), seguida pela amostra controle (CONTROLE) e a amostra que não recebeu adubação nitrogenada (NAOFERT). De acordo com este estimador, a amostra FERT possui uma riqueza 14,9% maior em relação a amostra CONTROLE que, por sua vez, apresenta uma riqueza 16,1% maior em relação a amostra NAOFERT. Finalmente, a amostra FERT possui uma riqueza de espécies que é 33,4% maior que aquela observada para a amostra NAOFERT. Estimativas através dos métodos de Jackknife e Bootstrap (SMITH & VAN BELLE, 1984) também foram calculadas. Assim como o método de Chao1, estes métodos estimam a riqueza baseados em espécies raras (DIAS, 2004). Os valores obtidos igualmente indicaram uma maior riqueza na amostra FERT, seguida das amostras CONTROLE e NAOFERT.

O índice de Shannon foi utilizado como um índice da diversidade da comunidade em cada amostra individualmente. Um índice de diversidade é uma medida matemática da diversidade de espécies em uma comunidade. Os índices de diversidade fornecem mais informação sobre a composição da comunidade do que simplesmente a riqueza de espécies; eles também levam em consideração a abundância relativa das diferentes espécies. Levando em consideração a abundância relativa, um índice de diversidade depende não somente da riqueza de espécies, mas também da sua equitabilidade. Estes fatores são considerados no cálculo do índice de Shannon para a diversidade de espécies ou OTU amostradas em cada comunidade. Este índice deriva da teoria da informação e o valor obtido é uma medida da incerteza (PINTO-COELHO, 2006). Quanto maior seu valor, mais diversa a comunidade se apresenta. Os valores obtidos para as comunidades de bactérias das amostras de solo concordam com os estimadores de riqueza e indicam novamente que a amostra FERT é a mais diversa,

seguida das amostras CONTROLE e NAOFERT. Entretanto, os valores calculados se mostraram muito próximos para as três amostras (TABELA 9 e FIGURA 15). Em conjunto os resultados mostram que a amostra FERT possui uma riqueza maior que as amostras NAOFERT e CONTROLE, mas quando se considera também a equitabilidade no cálculo, as três amostras apresentam valores de diversidade muito mais próximos, não diferindo significativamente.

Os estimadores Boneh e Efron (BONEH et al., 1998; EFRON, 1982) foram utilizados em seguida para estimar o número de novas OTU que se espera obter a partir de um número pré-determinado de novos indivíduos a serem coletados em um esforço amostral adicional. Estes índices permitem planejar uma amostragem extra, mas também são indicadores da diversidades contida nas amostras. Como esperado, devido a indicação de uma maior diversidade na amostra FERT a partir dos cálculos com os estimadores de riqueza e índice de diversidade de Shannon, os valores obtidos para os índices Boneh e Efron sugerem a obtenção de um número maior de OTU novas a partir de uma nova amostragem, seguida das amostras CONTROLE e NAOFERT.

Os estimadores de riqueza Chao1 e ACE foram também calculados a partir do número de OTU compartilhadas entre duas amostras, quando estas amostras foram agrupadas em pares, estimando assim a riqueza compartilhada entre duas comunidades. Em ambos os casos, os resultados indicaram uma maior riqueza compartilhada entre as amostras FERT e NAOFERT, sugerindo que o número de OTU comuns a estas duas amostras é maior que o número de OTU comuns às amostras CONTROLE e NAOFERT que, por sua vez, é maior que o número de OTU comuns observadas para o par de amostras CONTROLE e FERT. Uma vez que o critério para definição de OTU nas análises utilizou um valor de 3% de dissimilaridade, é possível que a maior parte das OTU compartilhadas entre as amostras representem

espécies comuns a estas amostras. Sendo assim, é possível concluir que as amostras FERT e NAOFERT compartilham mais espécies em comum do que as demais amostras. Este resultado pode sugerir que a adubação nitrogenada tem um efeito menor na diversidade da comunidade de bactérias quando comparada ao fator tempo. Esta observação pode ser melhor sentida através dos valores obtidos para o índice de diversidade ACE, que apresentou um valor muito maior para as amostras FERT e NAOFERT (20,50) quando comparado aos demais pares contendo a amostra CONTROLE (5,33 e 4,25), onde os índices foram bem mais próximos (TABELA 10 e FIGURA 15).

Os coeficientes de similaridade, baseados em abundância, Jaccard e Sorenson foram calculados a partir da combinação de duas amostras para determinar a fração de indivíduos que pertencem a OTU compartilhadas. Estes índices calculados desta forma podem ser usados para medir a similaridade na estrutura de duas comunidades. Como esperado, os índices indicaram uma similaridade muito maior na estrutura compartilhada das amostras FERT e NAOFERT (TABELA 10 e FIGURA 15). Os índices calculados para as amostras FERT ou NAOFERT em conjunto com a amostra CONTROLE ficaram muito próximos, novamente indicando que as amostras de solo após 13 meses de plantio, independentemente da adubação nitrogenada, diferem em níveis semelhantes quanto a similaridade na estrutura com a amostra CONTROLE.

Os mesmos coeficientes de similaridade (Jaccard e Sorenson) citados acima, foram também usados tomando como base para os cálculos de similaridade estimativas de riqueza observada ou Chao1. Neste caso, foram usados como uma medida na similaridade nos membros das comunidades para cada par de amostras comparadas (TABELA 10 e FIGURA 15).

Embora os estimadores de riqueza e, principalmente, de

diversidade tenham revelado somente uma pequena diferença entre as três amostras de solo analisadas (TABELA 9), comunidades com diversidade semelhantes podem apresentar diferenças significativas nas suas estruturas. As análises com múltiplas amostras permite avaliar estas diferenças a partir das OTU compartilhadas entre as comunidades. Os resultados apontam para uma maior semelhança na estrutura entre as comunidades das amostras de solo após 13 meses de cultivo e uma maior diferença entre estas e a comunidade da amostra CONTROLE (TABELA 10).

**TABELA 9. Medidas e estimativas da riqueza, diversidade e número adicional de OTU para as amostras individuais<sup>1</sup>.**

Método	CONTROLE	NAOFERT	FERT
Riqueza da comunidade			
Chao1	2415	2080	2775
Jackknife	138	128	148
Bootstrap	94,20	87,36	101,04
Diversidade da comunidade			
Shannon	4,23	4,16	4,30
Estimativa do número adicional de OTU em uma amostragem extra			
Boneh <sup>2</sup>	17,91	16,60	19,22
Efron <sup>2</sup>	69	64	74

<sup>1</sup>As medidas e estimativas foram realizadas a partir da definição de OTU com distância genética de 0,03.

<sup>2</sup>Os valores foram calculados considerando uma amostragem extra com a coleta de 50 novos indivíduos (ex., a obtenção de 50 sequências adicionais para cada amostra).

**TABELA 10.** Medidas e estimativas da riqueza e similaridade compartilhadas entre os pares de amostras<sup>1</sup>.

Método	CONTROLE-FERT	CONTROLE-NAOFERT	FERT-NAOFERT
Riqueza da comunidade compartilhada			
Chao1 <sup>2</sup>	3	4	7
ACE <sup>2</sup>	4,25	5,33	20,5
Similaridade na estrutura da comunidade			
Jaccard <sup>3</sup>	2,77	7,44	15,05
Sorenson <sup>3</sup>	0,04	0,05	0,16
Similaridade nos membros da comunidade			
Jaccard (observado) <sup>4</sup>	0,08	0,09	0,28
Jaccard (Chao1) <sup>4</sup>	0,04	0,06	0,10
Sorenson (observado)	0,02	0,03	0,05
Sorenson (Chao1) <sup>4</sup>	0,01	0,01	0,04

<sup>1</sup>As medidas e estimativas foram realizadas a partir da definição de OTU com distância genética de 0,03.

<sup>2</sup>Os comandos usados no programa Mothur para o cálculo destes índices foram: sharedchao para o cálculo do índice Chao1 e sharedace para o cálculo do índice ACE.

<sup>3</sup>Os comandos usados no programa Mothur para o cálculo destes índices foram: jabund para o cálculo do índice Jaccard e sorebund para o cálculo do índice Sorenson.

<sup>4</sup>Os comandos usados no programa Mothur para o cálculo destes índices foram: jclass e jest para o cálculo do índice de Jaccard baseado na riqueza observada ou na estimativa através do índice Chao1, respectivamente; sorclass e soreset para o cálculo do índice de Sorenson baseado na riqueza observada ou na estimativa através do índice Chao1, respectivamente.

De maneira geral todos os indicadores ou índices que foram utilizados concordam que a biblioteca FERT possui uma riqueza ou diversidade ligeiramente maior, seguida das amostras CONTROLE e NAOFERT, respectivamente. A biblioteca FERT foi construída a partir de uma amostra distante mais de um ano da amostra CONTROLE, sugerindo que a adubação nitrogenada possa ter contribuído para o aumento da riqueza ao longo do tempo. Entretanto, os dados de riqueza compartilhada mostraram maior proximidade entre as amostras FERT e NAOFERT, sugerindo que, apesar da maior diferença no número de espécies, as espécies presentes são mais próximas entre estas amostras, sofrendo uma menor influência da adubação nitrogenada, quando comparadas com a amostra CONTROLE.

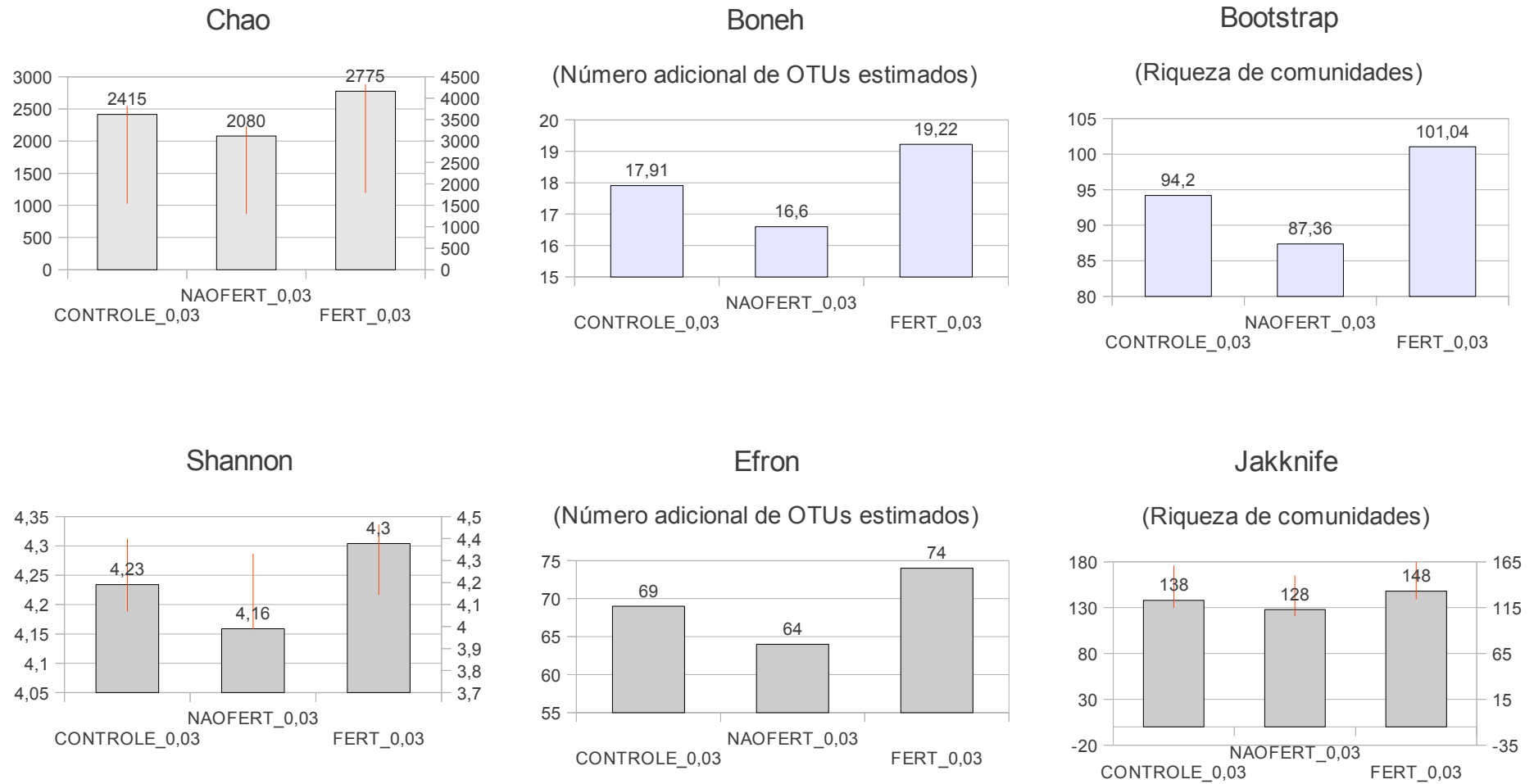
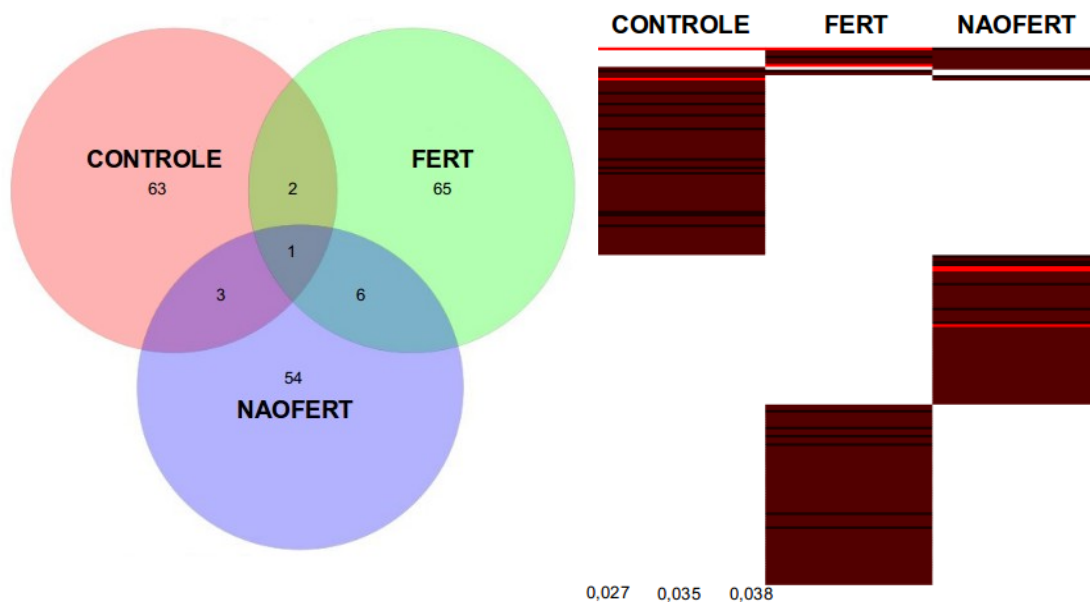


FIGURA 15. Estimadores de Riqueza de OTU por Biblioteca.



### 5.3.2.2 Diferenças na composição de OTU das comunidades bacterianas

O diagrama de Venn da FIGURA 16 mostra que há mais OTU em comum entre as bibliotecas FERT e NAOFERT. As bibliotecas CONTROLE e FERT compartilham o menor número de OTU, apenas 2. Conclusões adicionais podem ser tiradas através do diagrama *heatmap* representado na FIGURA 16. Neste diagrama cada OTU é representada por uma linha e o número de sequências em cada OTU é representada por uma escala de cores. As OTU compartilhadas entre as diferentes bibliotecas são mostradas em uma mesma linha. Desta forma, além de mostrar o compartilhamento de OTU, observado no diagrama de Venn, o *heatmap* mostra também as OTU que possuem grupos dominantes ou minoritários nas comunidades bacterianas de cada amostra. É possível observar que há poucos grupos dominantes (linhas vermelhas) em cada uma das bibliotecas e que a única OTU compartilhada entre as três bibliotecas (primeira linha) representa um grupo dominante nas comunidades de bactérias das bibliotecas CONTROLE e FERT, mas parece fazer parte dos grupos minoritários na biblioteca NAOFERT. Estes resultados ilustram o que foi obtido a partir da análise utilizando índices e estimadores da riqueza e diversidade.



**FIGURA 16.** Diagrama de Venn (esquerda) e heatmap (direita) mostrando o compartilhamento de OTU para as comunidades bacterianas das amostras de solo. Uma distância de 3% de dissimilaridade foi usada como critério de definição de OTU; o número total de OTU em cada grupo é: 69 para CONTROLE, 74 para FERT e 64 para NAOFERT; no heatmap, as OTU são representadas por linhas e a escala indica o log2 do número de sequências na OTU.

As bibliotecas analisadas mostram uma variação baixa de filotipos, com apenas 4 dos 15 filos bacterianos predominando em número. Entretanto, nas análises comparativas a 3% de dissimilaridade, como critério de definição de OTU, encontram-se claras indicações de que a estrutura das comunidades são diferentes entre as bibliotecas analisadas.

### 5.3.3 Análise baseada em testes de hipótese

Os testes de hipótese permitem determinar se há evidência suficiente para sugerir que a estrutura da comunidade presente em duas ou mais amostras são diferentes (SCHLOSS, 2008). Entretanto, estes testes não indicam um nível de similaridade, sendo para isso necessário análises baseadas em OTU. Para avaliar a semelhança das três amostras, os testes de Libshuff, Parsimônia e Unifrac, implementados no programa Mothur, foram utilizados.

A TABELA 11 mostra os resultados obtidos na análise de Libshuff, que procura avaliar se duas comunidades (bibliotecas) possuem a mesma estrutura, aplicando o teste estatístico de Cramer–Von Mises (Singleton et al., 2001). A coluna intitulada dCXYScore mostra o resultado do teste estatístico para cada comparação realizada e a coluna à direita o quão significativo é este valor, indicando a probabilidade da comunidade possuir a mesma estrutura devido ao acaso. De todos os valores de significância mostrados na coluna à direita, quase todos apresentam valores abaixo do limite de 0,05. Entretanto, a comparação de cada par de amostras requer a realização de dois testes de significância (ex., CONTROLE-FERT e FERT-CONTROLE) e as comparações entre as três amostras um total de 6 testes de significância. Sendo assim, uma correção para múltiplos testes de significância se faz necessário para minimizar o ERRO TIPO I (a probabilidade de detectar incorretamente uma diferença significativa) (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006). Aplicando a correção de Bonferroni a um nível de significância de 0,05 (alfa), temos um valor de significância limite para os testes de:  $0,05/6=0,0083$ . Considerando o limite de

significância corrigido, as comparações entre as amostras CONTROLE-FERT e FERT-CONTROLE apresentaram, ao menos, um dos valores de significância estatística abaixo do valor limite, indicando diferença na estrutura das comunidades destas amostras. O mesmo não é observado quando as amostras NAOFERT-FERT são comparadas, não sendo observado valor de significância estatística abaixo do valor limite, indicando que a estrutura da comunidade de bactérias nestas duas amostras são semelhantes.

Assim como o método libshuff, o método de parcimônia é usado para determinar se a estrutura de duas ou mais comunidades diferem estatisticamente. Os valores também não indicam um nível de similaridade. Esta abordagem tem a vantagem de: i) permitir a inclusão de vários tratamento em uma única análise, sem a necessidade de recorrer a múltiplas comparações e a correções dos valores de significância e ii) incluir diferentes métodos para análise filogenética (ex., baseado em distância, parcimônia e Bayesiana). A partir de uma árvore filogenética contendo as sequências de todos os tratamentos, o método calcula o menor número (mais parcimonioso) de transições na topologia da árvore, utilizando o algoritmo de Fitch, que permite explicar a covariação da filogenia com os tratamentos (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006).

O teste de Parsimônia indica que ao menos uma das bibliotecas ou comunidade apresenta uma estrutura distinta das outras, cujos valores gerais foram: 116,000000 para o valor de *score* e  $<0,0010$  para o valor de significância. Na TABELA 11 são mostrados os resultados para a análise de parcimônia quando as amostras foram comparadas aos pares. Neste caso, a aplicação de correção para os valores de significância estatística é necessária. Considerando um valor alfa igual a 0,05 e aplicando a correção de Bonferroni para as três comparações realizadas, chegamos a um valor limite de significância de 0,0167. Segundo a análise de parcimônia mostrada, todas as amostras apresentam uma estrutura de comunidade bacteriana diferentes entre si. Na análise feita a partir do método libshuff, a comparação entre as amostras NAOFERT e FERT não foi significativa, indicando que estas amostras não apresentam diferença nas suas estruturas. Entretanto, a análise de parcimônia

sugere haver diferença nas estruturas destas duas comunidades. É bem documentado que o teste de Bonferroni controla a probabilidade de falsos positivos (ERRO TIPO I – rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira) somente. Por outro lado, a correção é feita a custas de um aumento na probabilidade de produzir falsos negativos (ERRO TIPO II – aceitar a hipótese nula quando ela é falsa). Não é possível descartar a possibilidade de ocorrência de ERRO TIPO II na análise aplicada pelo método libshuff.

A análise de Unifrac também é utilizada para testar a hipótese de que duas ou mais comunidades possuem a mesma estrutura. Assim como a análise de parcimônia, a análise de Unifrac aplica o teste a partir de uma árvore filogenética onde as sequências estão identificadas quanto a origem das amostras. Os valores para a análise geral foram: 0,796714 para o *score* e  $<0,0010$  de significância, o que mostrou novamente que ao menos uma das bibliotecas era diferente das demais.

A TABELA 11 traz os resultados obtidos na análise de Unifrac das bibliotecas para a comparação das amostras entre pares, que permite determinar a(s) amostra(s) que apresentam diferença na estrutura da comunidade. Para esta análise uma correção para os valores de significância estatística também é necessária devido a comparação das amostra aos pares. Assim como na análise de parcimônia, foram necessários três testes para a análise de UniFrac e aplicando a correção de Bonferroni a um valor alfa de 0,05, chegamos a um valor limite de significância de 0,0167. Estes resultados concordam com aqueles obtidos para as análises das bibliotecas por parcimônia, com todas as comparações feitas apresentando diferença significativas. Estes resultados sugerem que há diferença na estrutura da comunidade bacteriana entre todas as três amostras analisadas.

As três análises possuem uma pequena discordância com relação à semelhança da estrutura da comunidade bacteriana nas três amostras. Os testes de Unifrac e Parsimônia revelaram que as três amostras ou bibliotecas possuem comunidades bacterianas diferentes entre si. Entretanto, o teste de Libshuff revelou que as amostras FERT-NAOFERT possuem a mesma estrutura na comunidade bacteriana. Para as comparações entre as amostras

CONTROLE-NAOFERT e CONTROLE-FERT houve concordância nos três testes, indicando que estas amostras possuem estruturas da comunidade bacteriana diferentes. Apesar da discordância do teste de Libshuff para a comparação das amostras NAOFERT-FERT, o valor de significância obtido, de 0,009, está próximo ao limite de significância de 0,0083 considerado para esta análise.

**TABELA 11. Resultados para os testes de significância para a comparação das amostras aos pares nas análises de teste de hipótese.**

Par de amostras	Parcimônia		UniFrac ponderado		Libshuff	
	Score	Valor P	Score	Valor P	Score (dCXY)	Valor P
CONTROLE-NAOFERT	44,000000	0,0010 <sup>+</sup>	0,249190	0,0090 <sup>+</sup>	0,51 (0,96)	1 (0*) <sup>1</sup>
CONTROLE-FERT	46,000000	<0,0010 <sup>+</sup>	0,236677	<0,0010 <sup>+</sup>	0,01 (0)	0* (0,03)
NAOFERT-FERT	44,000000	<0,0010 <sup>+</sup>	0,226461	<0,0010 <sup>+</sup>	0,97 (0,09)	0,009 (0,89)

\*Valores significativos, considerando um valor limite de significância de 0,0083; valor alfa limite de 0,05 dividido pelo número de comparações (correção de Bonferroni),  $0,05/6=0,0083$ .

<sup>+</sup>Valores significativos, considerando um valor limite de significância de 0,01667; valor alfa limite de 0,05 dividido pelo número de comparações (correção de Bonferroni),  $0,05/3=0,0167$ .

<sup>1</sup>Os números entre parênteses indicam valores de significância para comparação do par de amostra no sentido oposto, ex. CONTROLE-NAOFERT (FERT-CONTROLE).

## 6 Conclusões

A grande maioria dos trabalhos publicados sobre análise de bactérias associadas a cana-de-açúcar estuda apenas os endófitos encontrados nas raízes, folhas e caules de plantas de cana-de-açúcar (PARIONA-LLANOS et al., 2010; SARAVANAN et al., 2007). A comunidade bacteriana associada com a rizosfera de gramíneas, tem sido abordada, normalmente em estudos em arroz e milho (ROESCH et al., 2008; SUN et al., 2008).

A análise visual dos perfis de ARDRA não mostrou mudança perceptível na estrutura da comunidade bacteriana quando comparadas as amostras de solo aderido à raiz dos tratamentos fertilizado e não-fertilizado, sugerindo que, para grandes grupos taxonômicos (ex., filos), a comunidade bacteriana se manteve estável ao longo dos 13 meses de acompanhamento. Diferentemente do que foi observado para a análise de ARDRA, uma maior proximidade das amostras que receberam adubação nitrogenada daquelas que não receberam adubação foi observada na análise de RFLP do gene *nifH*. Este resultado foi novamente observado para a análise de RFLP do gene *nirK*. Entretanto, utilizando esta técnica, não é possível inferir se a diversidade dos grupos é maior nas comunidades das amostras que receberam adubação nitrogenada ou naquelas que não receberam adubação.

Uma distribuição de filos semelhante foi também obtida através da identificação taxonômica das sequências dos clones para o gene 16S rRNA, com pequenas variações. Estes dados confirmam os resultados obtidos para as análises de ARDRA, mostrando que não há grandes diferenças entre as comunidades em níveis taxonômicos mais altos. As sequências que não foram identificadas (unclassified), contaram com 13,6% do total.

Os filos bacterianos observados em maior proporção nas bibliotecas foram: Acidobactéria (23,4%), Bacteroidetes (12,1%), Firmicutes (10,2%), Actinobacteria (5,6%), e as Proteobactérias (24,0%). Dentre as Proteobactérias, as classes Alphaproteobactérias (12,4%) e Betaproteobactérias (9,8%) foram as mais representadas; as classes Gamaproteobactérias (1,3%) e Deltaproteobactérias (0,4%) mostraram poucos representantes. Nestas



análises, o gênero *Bacillus* (filo Firmicutes) foi o predominante, representando 19,7% das sequências classificadas até gênero. A maior parte destas sequências mostrou alta identidade com sequências do gene 16S rRNA de *Bacillus* identificados em amostras de solos contaminados e agrícolas. Por outro lado, diferentes gêneros, contendo bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular leguminosas (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*) ou se associarem a diversos grupos de plantas (*Azospirillum* e *Burkholderia*) foram também encontrados, mas as três bibliotecas apresentaram um número baixo de gêneros contendo espécies capazes de colonizar endofiticamente plantas de cana-de-açúcar. Para as sequências identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia*, alta identidade foi observada com estirpes isoladas de solos agrícolas e em associação com plantas. Algumas sequências foram também identificadas como pertencentes ao gênero *Nitrospira*, que possui representantes capazes de oxidar amônia.

As análises baseadas em OTU mostraram que a diversidade dos genes bacterianos de 16S rRNA encontrada nas três bibliotecas construídas a partir de DNA extraído de amostras de solo aderido à raiz de cana-de-açúcar mostram diferenças significativas, indicando uma diferença na composição das comunidades bacterianas. Em conjunto os resultados para os cálculos de índices e estimadores da diversidade mostram que a amostra FERT possui uma riqueza maior que as amostras NAOFERT e CONTROLE, mas quando se considera também a equitabilidade no cálculo, as três amostras apresentam valores de diversidade muito mais próximos, sem grandes diferenças. Foi mostrado que as amostras FERT e NAOFERT compartilham mais espécies em comum e possuem uma estrutura que se assemelha mais do que estas amostras com a amostra CONTROLE. Este resultado pode sugerir que a adubação nitrogenada tem um efeito menor na diversidade da comunidade de bactérias quando comparada ao fator tempo. Os resultados mostraram também que existem poucos grupos dominantes em cada uma das bibliotecas e a única OTU compartilhada entre as três bibliotecas representa um grupo dominante nas comunidades de bactérias das bibliotecas CONTROLE e FERT, mas constitui um grupo minoritário na biblioteca NAOFERT.

As análises baseadas em testes de hipótese, de forma geral, revelaram que as três amostras ou bibliotecas possuem comunidades bacterianas diferentes entre si.

De forma conjunta, os resultados para todas as análises baseadas em OTU realizadas indicaram que, em torno do nível de espécies, há uma proximidade na diversidade das amostras mas, por outro lado, estas diferem quanto a estrutura da comunidade, compartilhando poucos grupos taxonômicos em comum.

## Referências bibliográficas

- AISSLABIE, J. M.; CHHOUR, K. L.; SAUL, D. J.; MIYAUCHI, S.; AYTON, J.; PAETZOLD, R. F. e BALKS, M. R. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica, **Soil Biology and Biochemistry**, p. 3041-3056, v. 38, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403–410. 1990.
- AMADOU, C.; PASCAL, G.; MANGENOT, S.; GLEW, M.; BONTEMPS, C.; CAPELA, D.; CARRÈRE, S.; CRUVEILLER, S.; DOSSAT, C.; LAJUS, A.; MARCHETTI, M.; POINSOT, V.; ROUY, Z.; SERVIN, B.; SAAD, M.; SCHENOWITZ, C.; BARBE, V.; BATUT, J.; MÉDIGUE, C.; MASSON-BOIVIN, C. Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. **Genome Research**, v. 18, p. 1472-1483, 2008.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 7724-7736, 2005.
- ATKINSON, D.; WATSON, C. A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 10, p. 99-104, 2000.
- BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 541-555, 2003.
- BARROS, R. S. M. Medidas de diversidade biológica. Programa de pós-graduação em ecologia. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. <<http://www.ufjf.br/ecologia/material-didatico/>> Acesso em 10 de Julho de 2007.
- Bioimaging Systems Overview <<http://uvp.com/systemsoverview.html>> Acesso em 06 de Julho de 2006.
- BOHANNAN, B. J. E HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 282–287. 2003.
- BONEH, S., BONEH, A. AND CARON, R. J. Estimating the prediction function and the number of unseen species in sampling with replacement. **Journal of American Statistics Association**. 93, 372-379. 1998.

- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n.7, p. 2647-2653, 1997.
- BOTHE, H., H. JOST, M. SCHLOTTER, B.B. WARD & K-P WITZEL. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiology Reviews**. V. 24. p. 673-690. 2000.
- BREITBART, M., SALAMON, P., ANDRESEN, B., MAHAFFY, J. M., SEGALL, A. M., MEAD, D., AZAM, F. e ROHWER, F. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 14250-14255. 2002.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.
- BUCKLEY, D. H. & SCHMIDT, T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 11-21, 2001.
- CAVALCANTE, V. AND DÖBEBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with the sugarcane. **Plant Soil**. 108, p. 23-31. 1988.
- CHAO A. & LEE, S.-M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of American Statistical Association**., n. 87, p. 210–217, 1992.
- CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, v. 43, p. 783-791, 1987.
- CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**., n.11, p. 265–270, 1984.
- CHEN, L.S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F.O. & HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 66, p. 5099-5103, 2000.
- CLAESSON, M. J.; SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILA, J.; JULIAN R. MARCHESI, J. R.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; R. PAUL ROSS, R. P. e PAUL W. O'TOOLE, P. W. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine . **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, 2009.
- COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; McGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucl. Acids Res.**, v. 37(suppl 1) p. D141-D145, 2009.
- COLWELL, R. K., C. X. MAO, & J. CHANG. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. **Ecology**, v. 85, p. 2717-2727, 2004.
- CONN, H. J. The microscopic study of bacteria and fungi in soil. **Agricultural Experiment Station Technical Report** ., v. 64, p. 3-20, 1918.

COSTA, R.; GOMES, N. C. M.; PEIXOTO, R. S.; RUMJANEK, N.; BERG, G.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SMALLA, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2434-2447, 2006.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, K.; BRODIE, E. L.; LARSEN, N.; PICENO, Y. M.; PHAN, R. E. ANDERSEN, G. L. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W394-W399. 2006.

DeSANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 5069-5072, 2006.

DIAS, S. C. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 373-379, 2004.

DRANCOURT, M. & RAOULT, D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4311-4315, 2005.

DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S. M.; DAVIS, J. A.; KUSKE, C. R. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1662-1669, 1999.

EFRON, B. The Jackknife, the Bootstrap and other Resampling Plans, Vol. 38 of CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Society for Industrial and Applied Mathematics (SIAM), Philadelphia, United States. 1982.

EMBRAPA - CANA-DE-AÇÚCAR: UMA ALTERNATIVA DE ALIMENTO PARA A SECA <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/cot/COT73.html>> Acesso em 11 de julho de 2006.

EMBRAPA - Impacto Ambiental da Cana-de-Açúcar Disponível em: <<http://www.cana.cnpqm.embrapa.br/>> Acesso em Junho de 2010.

EWING, B. & GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FAORO, H, ALVES, A. C., SOUZA, E. M., RIGO, L. U., CRUZ, L. M., S. M. AL-JANABI, MONTEIRO, R. A., BAURA, V. A. E PEDROSA, F. O. Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, p. 4744 - 4749. 2010.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6**. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2005.

FELSKE, A. & AKKERMANS, A. D. L. Spatial homogeneity of the most abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p. 31-36, 1998.

FELSKE, A. & OSBORN, A. M. DNA fingerprinting of microbial communities. In: Osborn, A. M. & Smith, C. J. (eds). **Molecular microbial ecology**, Taylor & Francis, New York, 381p, 2005.

FFTC - Food and Fertilizer Technology center  
<<http://www.agnet.org/library/var/10/>> Acesso em 06 de Julho de 2006.

FIERER, N. & JACKSON, B. The diversity and biogeograph of soil bacterial communities. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 103, p. 626-631, 2006.

FUENTES-RAMIREZ, L.E. ; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J. E MARTINEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization, **FEMS Microbiology Ecology**. v. 29, p. 117–128. 1999.

FULTHORPE, R. R.; ROESCH, L. F. W.; RIVA, A. E TRIPLET, E. W. Distantly sampled soils carry few species in common. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 2, n. 9, p. 901-910, 2008.

GANS, J.; WOILINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v. 309, p. 1387-1390, 2005.

GARRITY, G.M., BELL, J.A. E LILBURN, T.G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New York.: 1-399. 2004.

GIRVAN, M. S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J. N.; OSBORN, A. M.; BALL, A. S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1800-1809, 2003.

GONZALEZ, J. M.; ZIMMERMANN, J.; SIZ-JIMENEZ, C. Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. **Bioinformatics**, v. 21, n. 3, p. 333-337, 2005.

HALL, T. A . BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRISON, M.; DIXON, R. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 6, p. 643-659, 1993.

HELTSHE, J. & FORRESTER, N.E. ESTIMATING SPECIES RICHNESS USING THE JACKKNIFE PROCEDURE. **BIOMETRICS** . N. 39, P. 1-11. 1983.

HERTENBERGER, G.; ZAMPACH, P.; BACHMANN, G. Plant species affect the concentration of free sugars and free amino acids in different types of soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 165, n. 5, p. 557-565, 2002.

HILTNER, L. Ueber neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie und unter besonderer BerUcksichtigung der Grundung und Brache. **Arb. Deut. Landw. Gesell**, v. 98, p. 59-78, 1904.

HONGH, Y.; YUZAWA, H.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, p. 299-304, 2003.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics Applications Note**, v. 20, n. 14, p. 2317-2319, 2004.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Tibtech**, v. 14, p. 190-197, 1996.

HUGHES J. B.; HELLMANN J. J.; RICKETTS T. H. e BOHANNAN B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.** 1908.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crop Research**. v. 65, p.197-209. 2000.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JANSSEN, P. H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JENSEN, V. **The plate count technique**, p. 158–170. In T. R. G. Gray and D. Parkinson (ed.), *The ecology of soil bacteria*. Liverpool University Press, Liverpool, United Kingdom. 1968.

KANG, S. C.; HA, C. G.; LEE, T. G.; MAHESHWARI, D. K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp PS 102. **Current Science**, v. 82, n. 4, p. 439-442, 2002.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n. 1, p. 29-43, 2007.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, Angers, v. 2, p. 879-882, 1978.

KOWALCHUK, G. A.; DE SOUZA, F. A.; VAN VEEN, J. A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 3, p. 571-581, 2002.

KREBS, C.J. **Ecological methodology**. 2nd ed. New York: Addison Wesley Longman, 620, 1998.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004 .

LANE, D. J. **16S/23S rRNA sequencing**. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. London: Wiley. 1991.

LANE, D.J.; STAHL, D.A.; OLSEN, G.J.; HELLER, D.J.; PACE, N.R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 163, n. 1, p. 75-81, 1985.

LARGET, e HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 5485–5492. 2004.

LEE, Z. M. P.; BUSSEMA III, C.; SCHMIDT, T. M. RnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. database issue, p. D489-D493, 2009.

LIESACK, W.; JANSSEN, H. P.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; STACKEBRANDT, E. **Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques**. In: *Modern Soil Microbiology*, 1997.

LIU, W.-T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LORANGER-MERCIRIS, G., BARTHES, L., GASTINE, A. E LEADLEY, P. Rapid effects of plant species diversity and identity on soil microbial communities in experimental grassland ecosystems, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 2336–2343, 2006.

LOZUPONE, C., & R. KNIGHT. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 8228–8235, 2005.

LUDWIG, W.; STRUNK, O .; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR, BUCHNER, A .; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A. W.; GROSS, O .; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A .; LISS, T.; LÜSSMANN, R.; MAY, M.;



NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A. ; STUCKMANN, N.; VILBIG, A. ; LLENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K.-H. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**. v. 32, n. 4, p. 1363-1371, 2004.

MAGNANI, G. S. **Análise da biodiversidade de bactérias endofíticas de colmo de cana-de-açúcar cultivada no noroeste do Paraná**. Curitiba, 2009. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

MAGNANI, G. S., DIDONET, C.M. ; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O. E SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane . **Genetics and Molecular Research**., v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MAGURRAN, A. E. **Ecological Diversity and its Measurement**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press; 1988.

MALLORY-SMITH, C. A.; RETZINGER, E. J. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. **Weed Technology**, v. 17, n. 3, p. 605-617, 2003.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; DYMOCK, D.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 795-799, 1998.

MARTIN, A. P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 3673–3682, 2002.

MARTINS, F. R. & SANTOS, F. A. M. Técnicas usuais de estimativa da biodiversidade. **Revista Holos**, Edição Especial, p. 236-267, 2009.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário Estatístico de Agroenergia. <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)> Acesso em Junho de 2010.

MOTAVALLI, P. P., KREMER, R. J., M. FANG, M. e MEANS, N. E. Impact of Genetically Modified Crops and Their Management on Soil Microbially Mediated Plant Nutrient Transformations, **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 816-824, 2004.

NAWROCKI, E. P.; KOLBE, D. L.; EDDY, S. R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1335-1337, 2009.

NEEFS, J.-M.; PEER, Y. V.; HENDRIKS, L.; WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 2237-2317, 1990.

NEEFS, J.M.; VAN DE PEER, Y.; RIJK, P.; CHAPELLE, S. E WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 13 p. 3025-3049 . 1993.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: **NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY**, 12th, 1999, Foz do Iguaçu. Proceedings. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 3-8, 1999.

NUBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 422-443, 1999.

OLIVARES, F.L., BALDANI, V.L.D., REIS, V.M., BALDANI, J.I. E DOBEBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OSBORN, A.M. **Molecular Microbial Ecology**. 1st ed. BIOS Scientific Publ, 2005.

OSBORNE, C. A., Galic, M., Sangwan, P., Janssen, PH. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific iniciadores. **FEMS Microbiology Letters**, v. 15, p. 248, n. 2, p. 183-187, 2005.

PACE, N. R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, v. 62, p. 463-470, 1996.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbiology Ecology**, v. 9, p. 1-55, 1986.

PARIONA-LLANOS, R.; FERRARA, F.I.S.; GONZALES, H.H.S. E BARBOSA, H.R. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, In Press, Corrected Proof, Available online 31 August 2010.

PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em ecologia**. Artmed Editora. Porto Alegre, 2006, 252p.

PRADHAN, N.; SUKLA, L. B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 850-854, 2006.

PRESTON FW, The commonness and rarity, of species. **Ecology**, v. 29 p. 254-283. 1948.

PRIEMÉ, A.; GESCHE BRAKER, G. e TIEDJE, J. M. Diversity of Nitrite Reductase (*nirK* and *nirS*) Gene Fragments in Forested Upland and Wetland Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1893-1900. 2002.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 244, p. 9-17, 2002.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B.; LUDWIG, W.; J. PEPLIES, J. e F. O. GLÖCKNER. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**. v. 35, n. 21, p. 7188-7196. 2007.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucl. Acids Res.**, v. 35, n. 21, p. 7188-7196, 2007.

RENGEL, Z. Genetic control of root exudation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n. 1, p. 59- 70, 2002.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 897- 906, 2001.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M. **Prokaryotic systematics: PCR and sequence analysis of amplified 16S rRNA genes**. In: OSBORN, A. M.; SMITH, C. J. (editors). *Molecular microbial ecology*. Taylor & Francis Group. New York, Chapter 2. 381p., 2005.

RÖSCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. E TRIPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil**, v. 302, p. 91–104, 2008.

RÖSCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K. M. ; KENT, A.D. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J.**, v.1, n. 4, p. 283-290, 2007.

RÖSCH, C.; EILMUS, S. E BOTHE, H.. Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. **Biochemical Society Transactions** . v. 34, p. 169–173. 2006.

RÖSCH, C.; EILMUS, S.; BOTHE, H. **Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats**. The 11<sup>th</sup> Nitrogen Cycle Meeting, 2005.

RÖSCH, C.; MERGEL, A.; e BOTHE, H. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3818–3829. 2002.

ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C. L.; LOZUPONE, C. E. CAPORASO J. G. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.*, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.

RUSCHEL, A.P. **Associative N<sub>2</sub>-fixation by sugar cane**. In: *Associative N<sub>2</sub>-Fixation*, Vol. 2 (Vose, P.B. and Ruschel, A.P., Eds.), p. 81-90. CRC Press, Baton Rouge. 1981.

RUVKUN, G. B. & AUSUBEL, F. M. Interspecies homology of nitrogenase genes. **Proceedings of The National Academy of Science**, v. 77, p. 191–195. 1980.

SALLES, J.F.; VAN VEEN, J.A. e VAN ELSAS, J.D. Multivariate Analyses of *Burkholderia* Species in Soil: Effect of Crop and Land Use History. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4012-4020, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.1989.

SANDERS, H.L. Marine benthic diversity: a comparative study. **American Naturalist**. 102:243-282. 1968.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M. E SA, T.M. Ecological Occurrence of Gluconacetobacter diazotrophicus and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 1, p. 130-40, 2007.

SCHIRMER, A.; GADKARI, R.; REEVES, C. D.; IBRAHIM, F.; DELONG, E. F.; HUTCHINSON, R. Metagenomic Analysis Reveals Diverse Polyketide Synthase GeneClusters in Microorganisms Associated with the Marine Sponge *Discodermia dissolute*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 71, n. 8, p. 4840-4849, 2005.

SCHLOSS, P. D. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. **The ISME Journal**, v. 2, p. 265-275, 2008.

SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLOS Computational Biology**, v. 2, p. 786-793, 2006a.

SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6773-6779, 2006b.

SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Introducing TreeClimber, a test to compare microbial community structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2379-2384, 2006c.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P. D.; LARGET, B. R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P.D., WESTCOTT, S.L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., LESNIEWSKI, R. A., OAKLEY, B. B., PARKS, D. H., ROBINSON, C. J., JASON W. SAHL, J. W., STRES, B., THALLINGER, G. G., VAN HORN, D. J., E WEBE, C. F. Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Appl Environ Microbiol**. v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SEGURITAN, V. & ROHWER, F. FastGroup: a program to dereplicate libraries of 16S rDNA sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 2, p. 9, 2001.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University Illinois Press, 1949.

SIMBERLOFF, D. S. Properties of the rarefaction diversity Measurement. **American Naturalist**., v. 106, p. 414-418, 1972.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v. 163, p. 688, 1949.

SINGLETON, D. R.; FURLONG, M. A.; RATHBUN, S. L.; WHITMAN, W. B. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4374–4376, 2001.

SMITH, E.P. & VAN BELLE, G. 1984. Nonparametric estimation of species richness. **Biometrics**, n. 40, p.119-129, 1984.

Soil sediment & water - Rhizosphere, the twilight zone of the hidden half < <http://www.aehsmag.com/issues/2001/december/rhizosphere.htm> > Acesso em 11 de julho de 2006.

SPAIN, A M.; KRUMHOLZ, L. R. E ELSHAHED, M. S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. **ISME Journal**., v. 3, n. 8, p. 992-1000, 2009.

STACH, J. E. M.; MALDONADO, L. A.; MASSON, D. G.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6189-6200, 2003.

STURSA, P.; UHLÍK, O. ; KURZAWOVÁ, V.; KOUBEK, J.; IONESCU, M.; STROHALM, M.; LOVECKÁ, P.; MACEK, T.; MACKOVÁ, M. Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. **Plant Soil Environment**, v. 55, n. 9, p. 389-396, 2009.

SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 17, p. 39-45. 2001.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X. E SONG, W. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) . **Microbial Ecology**., p. 55, v. 415–424, 2008.

Sustainable Management of Soil-rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use < <http://www.agnet.org/programs/0007.html> > Acesso em 12 de Janeiro de 2006.

SYLVIA, D. M.; CHELLEMI, D. O. Interactions among root inhabiting fungi and their implications for biological control of root pathogens. **Advances in Agronomy**, v. 73, p. 1-33, 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994a.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. **Comput. Appl. Biosci.**, v. 10, p. 19-29, 1994b.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Appl. Soil Ecol.**, v. 13, p. 109-122, 1999.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – Magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

TROBÄCK, J.N., ENWALL, K., JARVIS, A. e HALLIN, S. Reassessing PCR iniciadores targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**. V. 49, p. 401–407. 2004.

UPCHURCH, R.; CHIU, C.; EVERETT, K.; DYSZYNSKI, G.; COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W.B. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1294–1305, 2008.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA., ed. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 34, 1997.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; JAMES M. TIEDJE, J. M. e COLE, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WEAVER, W.; C.E. SHANNON. **The Mathematical Theory of Communication**. Urbana, Illinois: University of Illinois. 1949.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WIELAND, G.; NEUMANN, R. E BACKHAUS, H. Variation of Microbial Communities in Soil, Rhizosphere, and Rhizoplane in Response to Crop Species, Soil Type, and Crop Development. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5849-5854, v. 67, n. 12. 2001.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE, C. R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, n. 15, p. 8392–8396, 2000.

WOODSON, S.A.; LEONTIS, N.B. Structure and dynamics of ribosomal RNA. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 3, p. 294–300, 1998.

YANG, C.-H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 345–351, 2000.

ZHANG, Z.; SCHWRTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1–2, p. 203–214, 2000.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L.B. **Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity**. In Kasha, M. and Pullman, B (editors). Horizons in Biochemistry. Academic Press, New York. pp. 189–225. 1962.

## Anexos

### COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

#### Meio Terrific Broth:

Bacto-triptona	12 g/L
Extrato de levedura	24 g/L
Glicerol	4 mL/L

#### Meio Lisogenic-Broth Agar (LA):

Tryptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Ágar	15 g/L

#### Meio SOB:

Bacto triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	0,584 g/L
Cloreto de potássio	0,186 g/L
Água destilada q.s.p.	1 L

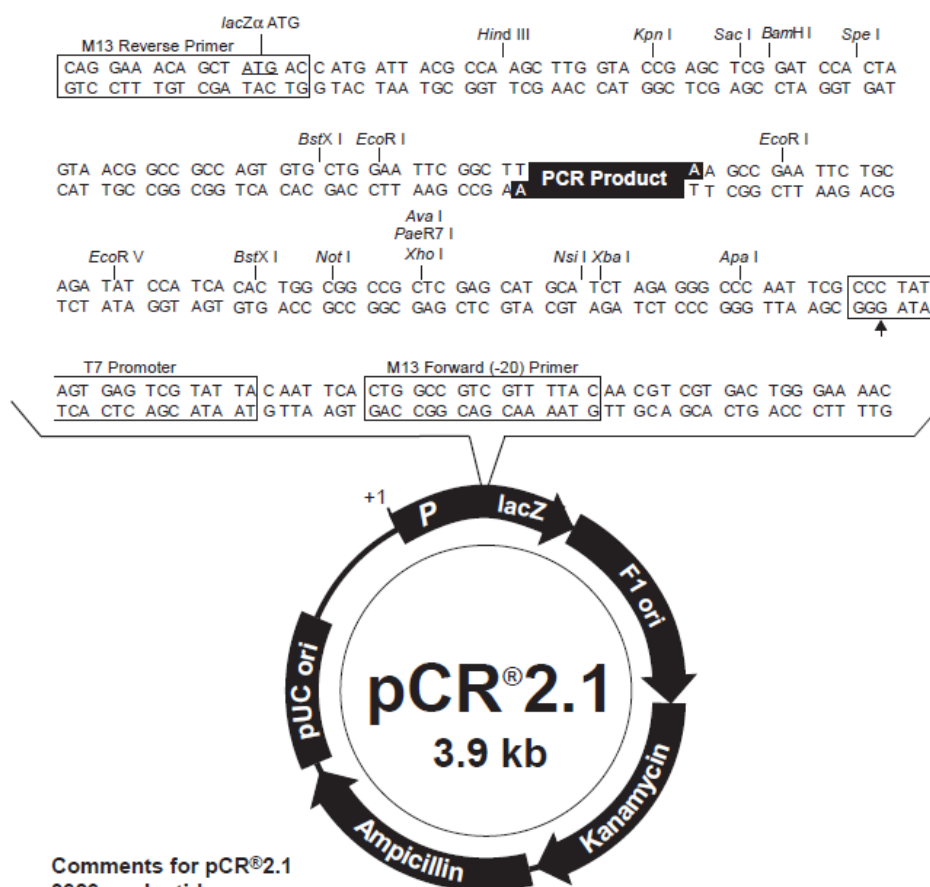
#### Meio SOC:

Tryptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,6 g/L
Kcl	0,19 g/L
MgCl <sub>2</sub>	0,94 g/L
MgSO <sub>4</sub>	1,2 g/L
Glucose	3,6 g/L
Água destilada q.s.p.	1 L



## MAPA DO VETOR PCR 2.1

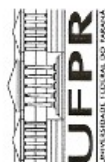
Mapa do vetor pCR 2.1 da Invitrogen, utilizado para a clonagem dos produtos de PCR.



Comments for pCR<sup>®</sup>2.1  
3929 nucleotides

*LacZα* gene: bases 1-545  
M13 Reverse priming site: bases 205-221  
T7 promoter: bases 362-381  
M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404  
f1 origin: bases 546-983  
Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111  
Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989  
pUC origin: bases 3134-3807

## ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SOLO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE SOLOS E  
ENGENHARIA AGRÍCOLA

Solicitante: GIOVANI PISA  
Endereço: Estação Experimental UFPR  
Cidade: Paranavai  
Estado: PR

Tel: 8886-3034/3257-3836

Cep:

CERTIFICADO N 12569

LAUDO DE ANÁLISE DE SOLO - ROTINA

Data: 4/5/2010

Nº LAB	Identificação da Amostra	pH		Al <sup>3+</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> cmol/dm <sup>3</sup>	K <sup>+</sup>	SB	T	P		S	C	V		Ca/Mg	
		CaCl <sub>2</sub>	SMP								mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>			%	m	%	
56321	26/09/06	5,30	7,00	0,00	2,40	1,20	0,60	0,41	2,21	4,61	17,30	-	14,3	48	0	2,00		
56322	09/05/06	5,20	7,00	0,00	2,40	1,00	0,50	0,14	1,64	4,04	12,40	-	7,8	41	0	2,00		
56323	18/10/07 C/N	5,20	6,90	0,00	2,50	1,00	0,70	0,21	1,91	4,41	35,90	-	9,6	43	0	1,43		
56324	18/10/07 S/N	5,30	7,10	0,00	2,20	1,20	0,60	0,21	2,01	4,21	30,70	-	6,9	48	0	2,00		
56325	17/11/06 C/N	4,90	6,90	0,10	2,50	1,10	0,30	0,11	1,51	4,01	65,10	-	6,9	38	6	3,67		
56326	17/11/06 S/N	5,10	6,90	0,00	2,50	2,10	0,50	0,23	2,83	5,33	132,00	-	7,8	53	0	4,20		
56327	20/01/07 C/N	4,70	6,80	0,20	2,70	1,10	0,40	0,13	1,63	4,33	97,40	-	11,5	38	11	2,75		
56328	20/01/07 S/N	5,40	7,00	0,00	2,40	1,20	0,50	0,06	1,76	4,16	23,60	-	9,6	42	0	2,40		
56329	08/03/07 C/N	4,60	6,90	0,20	2,50	1,00	0,30	0,05	1,35	3,85	17,30	-	11,5	35	13	3,33		
56330	08/03/07 S/N	4,60	6,90	0,20	2,50	1,00	0,20	0,15	1,35	3,85	11,40	-	10,5	35	13	5,00		
56331	08/05/07 C/N	4,60	6,90	0,20	2,50	1,00	0,30	0,06	1,36	3,86	4,60	-	10,5	35	13	3,33		
56332	08/05/07 S/N	4,90	7,00	0,10	2,40	1,00	0,40	0,06	1,46	3,86	4,80	-	9,6	38	6	2,50		
56333	27/06/07 C/N	4,90	6,90	0,10	2,50	1,00	0,30	0,18	1,48	3,98	12,80	-	8,7	37	6	3,33		
56334	27/06/07 S/N	5,00	7,00	0,00	2,40	1,00	0,30	0,19	1,49	3,89	13,90	-	7,8	38	0	3,33		



Resultados restritos às amostras recebidas. Neste laudo não constam recomendações.

Prof. Antonio C.V. Motta, PhD., INIA-PR 18725-D  
Coord. Lab. de Fertilidade do Solo

Rua dos Funcionários, 1540 - Curitiba, PR - CEP 80035-050 - Fone (041) 350 5673 - E-mail: depsolos@ufpr.br

1 de 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE SOLOS E  
ENGENHARIA AGRÍCOLA

Solicitante: GIOVANI PISA

Endereço: Estação Experimental UFPR

Cidade: Paranavai

Estado: PR

Cep:

Tel: 8886-3034/3257-3836

CERTIFICADO N 12559

LAUDO DE ANÁLISE DE SOLO - ROTINA

Data: 6/5/2010

Nº LAB	Identificação da Amostra	pH		Al <sup>3+</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	SB	T	P		S	C	V	m	Ca/Mg
		CaCl <sub>2</sub>	SMP								mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>			%	%	
56335	28/08/07 C/N	5,40	7,10	0,00	2,20	1,10	0,70	0,35	2,15	4,35	32,10	-	-	13,3	49	0	1,57
56336	28/08/07 S/N	5,80	7,20	0,00	2,00	1,10	0,70	0,40	2,20	4,20	28,50	-	-	13,3	52	0	1,57

Resultados restritos às amostras recebidas. Neste laudo não constam recomendações.

Prof. Antonio C.V. Motta, Ph.D., CREA-PR 18725-D  
Coord. Lab. de Fertilidade do Solo

Rua dos Funcionários, 1540 - Curitiba, PR - CEP 80035-050 - Fone (041) 350 5673 - E-mail: depsolos@ufpr.br

2 de 2

# **CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS CLONES PELO PROGRAMA CLASSIFIER-RDP II\*.**

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Família		Gênero	
C	R0SP4T2D10	319	Bacteria	95,00%										
C	ROSP1R4F08	252	Bacteria	98,00%										
C	R0SP4U1C09	296	Bacteria	99,00%										
C	ROSP1R3G05	525	Bacteria	100,00%										
C	ROSP1R6B04	600	Bacteria	100,00%										
C	ROSP1R6B08	469	Bacteria	100,00%										
C	ROSP1R3A02	427	Bacteria	100,00%										
C	ROSP1R5F11	502	Bacteria	100,00%										
C	ROSP1R5B08	463	Bacteria	100,00%										
C	ROSP1R3B02	560	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%								
C	ROSP1R6A11	465	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%								
C	ROSP1R3F06	501	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	93,00%	Deltaproteobacteria	92,00%						
C	ROSP1R2F06	345	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	95,00%	Deltaproteobacteria	91,00%						
C	ROSP1R5H12	474	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%						
C	R0SP4R1D03	333	Bacteria	100,00%	Verrucomicrobia	100,00%	Subdivision3	100,00%						
C	ROSP1R5C10	512	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	95,00%	Sphingobacteria	92,00%	Sphingobacteriales	92,00%				
C	ROSP1R3B01	457	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	96,00%	Acidobacteria_Gp1	96,00%	Gp1	96,00%				
C	ROSP1R5C10	512	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	95,00%	Sphingobacteria	92,00%	Sphingobacteriales	92,00%				
C	ROSP1R3B01	457	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	96,00%	Acidobacteria_Gp1	96,00%	Gp1	96,00%				
C	ROSP1R5D11	498	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp6	100,00%	Gp6	100,00%				
C	ROSP1R2C02	436	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
C	ROSP1R2F01	580	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	92,00%				
C	ROSP1R3F04	553	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%	Betaproteobacteria	99,00%	Burkholderiales	88,00%				
C	R0SP1T1E05	471	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
C	R0SP1U1E01	288	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp6	100,00%	Gp6	100,00%				
C	R0SP4R1B02	294	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
C	R0SP4R1B05	336	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp6	100,00%	Gp6	100,00%				
C	ROSP1R3B06	486	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp2	100,00%	Gp2	100,00%				
C	ROSP1R3C06	518	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Família		Gênero	
C	ROSP1R3D02	493	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	88,00%				
C	ROSP1R3E03	475	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
C	ROSP1R3F02	511	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
C	ROSP1R3F05	527	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%				
C	ROSP1R3H04	281	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%				
C	ROSP1R5B11	490	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
C	ROSP1R5E07	400	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%				
C	ROSP1R5G11	440	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
C	ROSP1R6B11	551	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
C	ROSP1R6G11	261	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
C	ROSP1R6B12	507	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Deltaproteobacteria	100,00%	Myxococcales	100,00%				
C	ROSP1R6D06	365	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Micromonosporaceae	94,00%		
C	ROSP1R6G12	405	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Flavobacteria	100,00%	Flavobacteriales	100,00%	Flavobacteriaceae	99,00%		
C	ROSP1R6H11	573	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	99,00%		
C	ROSP1R5A07	476	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	99,00%	Sphingobacteria	93,00%	Sphingobacteriales	93,00%	Cytophagaceae	80,00%		
C	ROP4R1B01	261	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	99,00%	Actinobacteria	99,00%	Actinomycetales	98,00%	Propionibacteriaceae	93,00%		
C	ROSP1R5F12	481	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Gammaproteobacteria	99,00%	Xanthomonadales	96,00%	Xanthomonadaceae	96,00%		
C	R0SP4T1E02	286	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
C	R0SP4T1E04	376	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Promicromonosporaceae	100,00%		
C	R0SP4T1H12	312	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	100,00%	Acetobacteraceae	100,00%		
C	R0SP1T1C09	492	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
C	R0SP4T2B07	261	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiales_incertae_sedis	90,00%		
C	R0SP4T2G10	389	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
C	ROSP1R3C05	594	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
C	ROSP1R3D04	555	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
C	ROSP1R3H03	605	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Micromonosporaceae	100,00%		
C	ROSP1R4E11	647	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
C	ROSP1R5B12	453	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Deltaproteobacteria	100,00%	Myxococcales	100,00%	Sorangiineae	99,00%		
C	ROSP1R5C11	432	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Comamonadaceae	80,00%		
C	ROSP1R5D05	494	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	99,00%		
C	ROSP1R5D12	451	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		



Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Família		Gênero	
N+	N+P3R1A08	550	Bacteria	98,00%										
N+	N+P3R1C08	596	Bacteria	100,00%										
N+	N+P3R1D06	539	Bacteria	100,00%										
N+	N+P3R1E09	331	Bacteria	99,00%										
N+	N+P3R1F07	601	Bacteria	100,00%										
N+	N+P3R1G09	400	Bacteria	100,00%										
N+	N+P1R1F09	467	Bacteria	99,00%	Proteobacteria	81,00%								
N+	N+P3R1D11	309	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	90,00%								
N+	N+P1R1C02	527	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	95,00%						
N+	N+P1R1G06	507	Bacteria	100,00%	Cyanobacteria	100,00%	Cyanobacteria	100,00%						
N+	N+P1R1H02	559	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	98,00%	Deltaproteobacteria	96,00%						
N+	N+P1R1H03	496	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	89,00%	Deltaproteobacteria	83,00%						
N+	N+P1T1B04	326	Bacteria	100,00%	OP10	80,00%	OP10_genera_incert ae_sedis	80,00%						
N+	N+P1T2H03	251	Bacteria	97,00%	Proteobacteria	85,00%	Deltaproteobacteria	80,00%						
N+	N+P3R1B08	461	Bacteria	100,00%	OP10	94,00%	OP10_genera_incert ae_sedis	94,00%						
N+	N+P3R1B11	465	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%	Deltaproteobacteria	96,00%						
N+	N+P3R1F03	436	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%						
N+	N+P3R1G07	543	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	99,00%						
N+	N+P1R1C08	568	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P1R1D04	430	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1R1E06	605	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1R1E07	583	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1R1F04	538	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1R1F06	571	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1R1F08	571	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P1R1G09	330	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
N+	N+P1R1H07	546	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1R1H08	469	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P1R1H09	530	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1T1H04	255	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P3R1B01	457	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Familia		Gênero	
N+	N+P3R1B05	515	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp5	100,00%	Gp5	100,00%				
N+	N+P3R1B07	623	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P3R1C01	402	Bacteria	100,00%	Verrucomicrobia	100,00%	Spartobacteria	100,00%	Spartobacteria_gen era_incertainae_sedis	100,00%				
N+	N+P3R1C03	495	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P3R1C06	432	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P3R1D01	465	Bacteria	100,00%	Verrucomicrobia	100,00%	Spartobacteria	100,00%	Spartobacteria_gen era_incertainae_sedis	100,00%				
N+	N+P3R1D02	616	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P3R1D03	583	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
N+	N+P3R1D10	528	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp6	100,00%	Gp6	100,00%				
N+	N+P3R1E02	500	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp5	100,00%	Gp5	100,00%				
N+	N+P3R1E05	525	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P3R1E06	448	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P3R1E07	457	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P3R1E10	491	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P3R1F05	595	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P3R1F09	482	Bacteria	100,00%	Cyanobacteria	100,00%	Cyanobacteria	100,00%	Streptophyta	100,00%				
N+	N+P3R1G02	371	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	99,00%	Burkholderiales	81,00%				
N+	N+P3R1G03	564	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	99,00%				
N+	N+P3R1G08	470	Bacteria	100,00%	Firmicutes	97,00%	Bacilli	95,00%	Bacillales	93,00%				
N+	N+P3R1G10	486	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	95,00%				
N+	N+P3R1H02	352	Bacteria	99,00%	Acidobacteria	87,00%	Acidobacteria_Gp1	86,00%	Gp1	86,00%				
N+	N+P3R1H06	416	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	R4SP1T1H04	289	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	81,00%	Sphingobacteriales	81,00%				
N+	N+P1R1F07	537	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Deltaproteobacteria	100,00%	Myxococcales	100,00%				
N+	N+P1R1A11	481	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P1R1B10	316	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	98,00%	Bacillaceae	89,00%		
N+	N+P1R1C07	412	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N+	N+P1R1E03	556	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N+	N+P1R1E04	490	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	96,00%		
N+	N+P1R1E09	502	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Deltaproteobacteria	100,00%	Myxococcales	100,00%	Cystobacteraceae	97,00%		
N+	N+P1R1F03	297	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	98,00%		



Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Familia		Gênero	
N+	N+P1R1G03	528	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Comamonadaceae	99,00%		
N+	N+P1R1G04	325	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N+	N+P1T1A04	269	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	96,00%		
N+	N+P1T2E03	427	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N+	N+P3R1B09	319	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	95,00%		
N+	N+P3R1C04	521	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N+	N+P3R1F04	513	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N+	N+P3R1H07	352	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	100,00%	Acetobacteraceae	100,00%		
N+	N+P1R1A04	454	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	99,00%	Bacillus	86,00%
N+	N+P1R1B09	443	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	99,00%	Bacillus	98,00%
N+	N+P1R1C03	318	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	98,00%	Bacillus	93,00%
N+	N+P1R1C04	586	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	100,00%
N+	N+P1R1C06	572	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Paenibacillaceae	100,00%	Paenibacillus	100,00%
N+	N+P1R1D03	557	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	98,00%
N+	N+P1R1D07	567	Bacteria	100,00%	Bacteria_incertae_sedis	100,00%	Ktedonobacteria	100,00%	Ktedonobacterales	100,00%	Ktedonobacteraceae	100,00%	Ktedonobacter	100,00%
N+	N+P1R1D09	412	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiaceae	100,00%	Ralstonia	100,00%
N+	N+P1R1E10	566	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	98,00%	Bacillus	93,00%
N+	N+P1R1F01	513	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%	Chitinophaga	100,00%
N+	N+P1R1F05	397	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiaceae	100,00%	Burkholderia	100,00%
N+	N+P1R1F10	555	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Tumebacillus	100,00%
N+	N+P1R1F12	447	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	80,00%
N+	N+P1R1G07	593	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiaceae	100,00%	Burkholderia	100,00%
N+	N+P1R1G08	584	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Rhizobiaceae	100,00%	Rhizobium	100,00%
N+	N+P1R1G10	528	Bacteria	100,00%	Bacteria_incertae_sedis	100,00%	Ktedonobacteria	100,00%	Ktedonobacterales	100,00%	Ktedonobacteraceae	100,00%	Ktedonobacter	100,00%
N+	N+P1R1H05	451	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	92,00%
N+	N+P1T2D03	299	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	98,00%	Bacillus	97,00%
N+	N+P3R1A04	598	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Rubrobacterales	100,00%	Rubrobacteraceae	100,00%	Rubrobacter	100,00%
N+	N+P3R1A05	465	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	100,00%	Acetobacteraceae	100,00%	Belnapia	100,00%
N+	N+P3R1A06	534	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	100,00%	Acetobacteraceae	100,00%	Belnapia	100,00%
N+	N+P3R1A09	596	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Sphingobacteriaceae	100,00%	Mucilaginibacter	100,00%
N+	N+P3R1B04	573	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Oxalobacteraceae	100,00%	Massilia	100,00%



Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Família		Gênero	
N+	N+P7R2H02	489	Bacteria	100,00%										
N+	N+P8R1H02	450	Bacteria	100,00%										
N+	N+P8R2C12	319	Bacteria	99,00%										
N+	N+P8R2H06	403	Bacteria	100,00%										
N+	N+P1T1B01	420	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	81,00%								
N+	N+P1T1B04	276	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%								
N+	N+P7R2E04	336	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	96,00%								
N+	N+P8R2C09	515	Bacteria	100,00%	Chloroflexi	91,00%								
N+	N+P1T1C02	483	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%	Deltaproteobacteria	97,00%						
N+	N+P7R2A08	411	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	93,00%						
N+	N+P7R2D06	368	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	88,00%	Actinobacteria	88,00%						
N+	N+P8R1F09	409	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	99,00%						
N+	N+P8R2D03	437	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Gammaproteobacteria	98,00%						
N+	N+P8R2E05	528	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	96,00%						
N+	N+P8R2F07	582	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	97,00%						
N+	N+P8R2F09	274	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	87,00%						
N+	N+P8R2F10	466	Bacteria	100,00%	TM7	100,00%	TM7_genera_incerta_e_sedis	100,00%						
N+	N+P8R2F12	431	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	96,00%	Deltaproteobacteria	94,00%						
N+	N+P1T1A10	491	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	98,00%	Burkholderiales	91,00%				
N+	N+P1T1A11	445	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1T1A12	450	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
N+	N+P1T1B11	311	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1T1C07	438	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P1T1C08	472	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P7R1D11	495	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Deltaproteobacteria	99,00%	Myxococcales	94,00%				
N+	N+P7R1D12	288	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	99,00%				
N+	N+P7R1E01	494	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	98,00%	Deltaproteobacteria	94,00%	Myxococcales	84,00%				
N+	N+P7R1F10	355	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	97,00%				
N+	N+P7R1G10	395	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P7R1H09	416	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	99,00%	Acidobacteria_Gp4	99,00%	Gp4	99,00%				
N+	N+P7R2A04	461	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Família		Gênero	
N+	N+P7R2B10	439	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%				
N+	N+P7R2D07	372	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	99,00%				
N+	N+P7R2F01	417	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	86,00%	Acidobacteria_Gp1	83,00%	Gp1	83,00%				
N+	N+P7R2F07	511	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	99,00%	Burkholderiales	89,00%				
N+	N+P7R2G05	495	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	98,00%	Burkholderiales	93,00%				
N+	N+P8R1D12	444	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	97,00%				
N+	N+P8R1E07	525	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp16	100,00%	Gp16	100,00%				
N+	N+P8R1G01	394	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	99,00%	Acidobacteria_Gp1	99,00%	Gp1	99,00%				
N+	N+P8R1G11	516	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
N+	N+P8R2A02	512	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N+	N+P8R2B10	440	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P8R2D07	599	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P8R2D08	502	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N+	N+P8R2D11	331	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	99,00%				
N+	N+P8R2E02	599	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp6	100,00%	Gp6	100,00%				
N+	N+P8R2E04	455	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	99,00%	Acidobacteria_Gp1	91,00%	Gp1	91,00%				
N+	N+P8R2E06	480	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Solirubrobacterales	81,00%				
N+	N+P8R2E08	518	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%				
N+	N+P8R2E10	459	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%				
N+	N+P8R2F08	361	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	95,00%	Acidobacteria_Gp1	95,00%	Gp1	95,00%				
N+	N+P8R2F11	453	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%				
N+	N+P1T1A03	396	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Clostridia	100,00%	Clostridiales	100,00%	Clostridiaceae	100,00%		
N+	N+P7R1C01	480	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	99,00%	Bacillaceae	98,00%		
N+	N+P7R1C03	393	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	98,00%	Bradyrhizobiaceae	90,00%		
N+	N+P7R2A01	417	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%	Alphaproteobacteria	98,00%	Rhodospirillales	93,00%	Rhodospirillaceae	82,00%		
N+	N+P7R2B01	441	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Sphingomonadales	92,00%	Sphingomonadaceae	92,00%		
N+	N+P7R2B03	387	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	99,00%	Hyphomicrobiaceae	83,00%		
N+	N+P7R2D02	499	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	100,00%	Acetobacteraceae	100,00%		
N+	N+P7R2E03	437	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Caulobacteriales	100,00%	Caulobacteraceae	100,00%		
N+	N+P7R2E12	254	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%	Betaproteobacteria	98,00%	Burkholderiales	97,00%	Burkholderiales_incertae_sedis	81,00%		
N+	N+P7R2G06	354	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Familia		Gênero	
N+	N+P8R1G07	522	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	94,00%		
N+	N+P8R1G10	489	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Gammaproteobacteria	100,00%	Xanthomonadales	97,00%	Xanthomonadaceae	97,00%		
N+	N+P8R2B04	547	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Hyphomicrobiaceae	80,00%		
N+	N+P8R2D01	282	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%	Alphaproteobacteria	96,00%	Sphingomonadales	85,00%	Sphingomonadaceae	80,00%		
N+	N+P8R2G02	451	Bacteria	100,00%	Planctomycetes	100,00%	Planctomycetacia	100,00%	Planctomycetales	100,00%	Planctomycetaceae	100,00%		
N+	N+P1T1A02	508	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%	Terrimonas	93,00%
N+	N+P1T1A04	510	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	99,00%
N+	N+P1T1A05	489	Bacteria	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospirales	100,00%	Nitrospiraceae	100,00%	Nitrospira	100,00%
N+	N+P1T1B03	390	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Paenibacillaceae	100,00%	Paenibacillus	99,00%
N+	N+P1T1B09	436	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	99,00%
N+	N+P1T1C01	341	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Gammaproteobacteria	100,00%	Xanthomonadales	100,00%	Sinobacteraceae	100,00%	Steroidobacter	100,00%
N+	N+P7R1D09	398	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Mycobacteriaceae	96,00%	Mycobacterium	96,00%
N+	N+P7R2A02	372	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Oxalobacteraceae	100,00%	Massilia	93,00%
N+	N+P7R2A05	306	Bacteria	100,00%	Gemmatimonadetes	80,00%	Gemmatimonadetes	80,00%	Gemmatimonadales	80,00%	Gemmatimonadaceae	80,00%	Gemmatimonas	80,00%
N+	N+P7R2A11	433	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiaceae	98,00%	Burkholderia	98,00%
N+	N+P7R2B07	450	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Flavobacteria	99,00%	Flavobacteriales	99,00%	Flavobacteriaceae	99,00%	Flavobacterium	92,00%
N+	N+P7R2B08	565	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Sphingobacteriaceae	100,00%	Mucilagibacter	98,00%
N+	N+P7R2D03	529	Bacteria	100,00%	Gemmatimonadetes	97,00%	Gemmatimonadetes	97,00%	Gemmatimonadales	97,00%	Gemmatimonadaceae	97,00%	Gemmatimonas	97,00%
N+	N+P7R2D04	582	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Streptomycetaceae	99,00%	Streptomyces	98,00%
N+	N+P7R2D05	360	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Phyllobacteriaceae	100,00%	Mesorhizobium	98,00%
N+	N+P7R2F05	574	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Bradyrhizobiaceae	100,00%	Bradyrhizobium	84,00%
N+	N+P7R2F06	560	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Phyllobacteriaceae	100,00%	Mesorhizobium	100,00%
N+	N+P7R2H08	414	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	98,00%	Hyphomicrobiaceae	88,00%	Rhodoplanes	84,00%
N+	N+P8R1B07	460	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	90,00%	Sphingobacteria	90,00%	Sphingobacteriales	90,00%	Chitinophagaceae	90,00%	Flavisolibacter	89,00%
N+	N+P8R1F02	341	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Hyphomicrobiaceae	100,00%	Hyphomicrobium	100,00%
N+	N+P8R1G06	438	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Bradyrhizobiaceae	100,00%	Bradyrhizobium	91,00%
N+	N+P8R1H01	388	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhodospirillales	100,00%	Rhodospirillaceae	100,00%	Azospirillum	96,00%
N+	N+P8R2A06	593	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Hyphomicrobiaceae	89,00%	Rhodoplanes	89,00%
N+	N+P8R2A12	293	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	97,00%	Bacillus	96,00%
N+	N+P8R2B06	629	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Micromonosporaceae	100,00%	Dactylosporangium	100,00%

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Familia		Gênero	
N+	N+P8R2B11	479	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Methylobacteriaceae	100,00%	Methylobacterium	100,00%
N+	N+P8R2C05	544	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Bradyrhizobiaceae	100,00%	Bradyrhizobium	98,00%
N+	N+P8R2C08	394	Bacteria	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospirales	100,00%	Nitrospiraceae	100,00%	Nitrospira	100,00%
N+	N+P8R2C11	515	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Deltaproteobacteria	100,00%	Myxococcales	100,00%	Cystobacteraceae	91,00%	Anaeromyxobacter	81,00%
N+	N+P8R2D04	409	Bacteria	100,00%	Bacteria_incertae_sedis	98,00%	Ktedonobacteria	98,00%	Ktedonobacteriales	98,00%	Ktedonobacteraceae	98,00%	Ktedonobacter	98,00%
N+	N+P8R2D05	530	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%	Flavisolibacter	96,00%
N+	N+P8R2E03	301	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Hyphomicrobiaceae	83,00%	Rhodoplanes	83,00%
N+	N+P8R2H08	491	Bacteria	100,00%	Bacteria_incertae_sedis	100,00%	Ktedonobacteria	100,00%	Ktedonobacteriales	100,00%	Ktedonobacteraceae	100,00%	Ktedonobacter	100,00%
N+	N+P8R2H10	410	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	99,00%	Deltaproteobacteria	99,00%	Myxococcales	99,00%	Cystobacteraceae	96,00%	Anaeromyxobacter	93,00%
N-	N-P1R1A12	285	Bacteria	98,00%										
N-	N-P1R2E11	359	Bacteria	100,00%										
N-	N-P1R2F02	331	Bacteria	99,00%										
N-	N-P1R3F05	584	Bacteria	100,00%	Verrucomicrobia	98,00%								
N-	N-P1R2E04	443	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	95,00%	Deltaproteobacteria	80,00%						
N-	N-P1R2F03	598	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%						
N-	N-P1R3G07	488	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%						
N-	N-P1R3G12	515	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%						
N-	N-P1R4A07	652	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Gammaproteobacteria	96,00%						
N-	N-P1N+01	616	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%						
N-	N-P1N+04	578	Bacteria	99,00%	BRC1	91,00%	BRC1_genera_incertae_sedis	91,00%						
N-	N-P1R4D08	398	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	93,00%	Deltaproteobacteria	91,00%						
N-	N-P1T2A11	340	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	94,00%	Actinobacteria	94,00%						
N-	N-P1R1D09	599	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R1D10	333	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	98,00%	Acidobacteria_Gp4	98,00%	Gp4	98,00%				
N-	N-P1R1E07	259	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	98,00%	Acidobacteria_Gp4	98,00%	Gp4	98,00%				
N-	N-P1R2B12	531	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp5	100,00%	Gp5	100,00%				
N-	N-P1R2C10	461	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R2E01	496	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R2G06	417	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	96,00%	Acidobacteria_Gp3	96,00%	Gp3	96,00%				
N-	N-P1R3A04	527	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Familia		Gênero	
N-	N-P1R3A10	655	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp6	100,00%	Gp6	100,00%				
N-	N-P1R3A12	441	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N-	N-P1R3F10	513	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp5	100,00%	Gp5	100,00%				
N-	N-P1R3G09	509	Bacteria	100,00%	Verrucomicrobia	100,00%	Spartobacteria	100,00%	Spartobacteria_gen era_incertae_sedis	100,00%				
N-	N-P1R3G11	715	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp7	100,00%	Gp7	100,00%				
N-	N-P1R3H03	493	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp5	100,00%	Gp5	100,00%				
N-	N-P1R3H08	403	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R4A05	487	Bacteria	100,00%	Verrucomicrobia	99,00%	Subdivision3	98,00%	Subdivision3_gene ra_incertae_sedis	98,00%				
N-	N-P1R4B11	458	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N-	N-P1N+09	466	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	99,00%				
N-	N-P1R4D02	399	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R4E05	625	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R4F01	388	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp5	100,00%	Gp5	100,00%				
N-	N-P1R4F04	251	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	97,00%	Acidobacteria_Gp4	97,00%	Gp4	97,00%				
N-	N-P1R4G01	451	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1T1A01	517	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N-	N-P1T1A02	473	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
N-	N-P1T1A03	459	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp1	100,00%	Gp1	100,00%				
N-	N-P1T1B04	389	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
N-	N-P1T1G02	412	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R1B02	325	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	99,00%	Rhizobiales	96,00%				
N-	N-P1R1B04	641	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp3	100,00%	Gp3	100,00%				
N-	N-P1R1B06	623	Bacteria	100,00%	Acidobacteria	100,00%	Acidobacteria_Gp4	100,00%	Gp4	100,00%				
N-	N-P1R1B01	556	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N-	N-P1R2G10	265	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	99,00%		
N-	N-P1R3G08	470	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Bradyrhizobiaceae	100,00%		
N-	N-P1R3G10	265	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	99,00%	Sphingobacteriales	99,00%	Chitinophagaceae	99,00%		
N-	N-P1R3H05	550	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N-	N-P1R4G10	288	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%		
N-	N-P1R1B07	294	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiales_incertae_ sedis	98,00%	Methylibium	87,00%

Bibl.	Nome	Comp.	Domínio		Filo		Classe		Ordem		Família		Gênero	
N-	N-P1R1B08	266	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	98,00%	Bacillus	86,00%
N-	N-P1R1C11	515	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%	Terimonas	97,00%
N-	N-P1R1D04	424	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	99,00%	Bacillus	84,00%
N-	N-P1R1F07	587	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	99,00%
N-	N-P1R2B03	483	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Deltaproteobacteria	100,00%	Bdellovibrionales	99,00%	Bdellovibrionaceae	98,00%	Bdellovibrio	98,00%
N-	N-P1R2C03	651	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	97,00%
N-	N-P1R2D11	665	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%	Niastella	98,00%
N-	N-P1R2D12	519	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%	Niastella	98,00%
N-	N-P1R2E10	619	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Flavobacteria	100,00%	Flavobacteriales	100,00%	Flavobacteriaceae	100,00%	Chryseobacterium	100,00%
N-	N-P1R2F11	630	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Oxalobacteraceae	100,00%	Massilia	100,00%
N-	N-P1R2G03	568	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiaceae	100,00%	Burkholderia	100,00%
N-	N-P1R3A09	666	Bacteria	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospirales	100,00%	Nitrospiraceae	100,00%	Nitrospira	100,00%
N-	N-P1R3B03	483	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	98,00%	Deltaproteobacteria	98,00%	Bdellovibrionales	98,00%	Bdellovibrionaceae	97,00%	Bdellovibrio	97,00%
N-	N-P1R3C08	561	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Gammaproteobacteria	100,00%	Xanthomonadales	100,00%	Sinobacteraceae	100,00%	Steroidobacter	100,00%
N-	N-P1R3D12	519	Bacteria	100,00%	Bacteroidetes	100,00%	Sphingobacteria	100,00%	Sphingobacteriales	100,00%	Chitinophagaceae	100,00%	Niastella	98,00%
N-	N-P1R3G04	424	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	99,00%	Bacillales	99,00%	Paenibacillaceae	97,00%	Paenibacillus	97,00%
N-	N-P1R3H11	596	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Alphaproteobacteria	100,00%	Rhizobiales	100,00%	Xanthobacteraceae	96,00%	Pseudolabrys	96,00%
N-	N-P1R4A08	470	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Bacillaceae	100,00%	Bacillus	94,00%
N-	N-P1R4B07	508	Bacteria	100,00%	Proteobacteria	100,00%	Betaproteobacteria	100,00%	Burkholderiales	100,00%	Burkholderiales_incertae_sedis	100,00%	Methylbium	92,00%
N-	N-P1R4B09	622	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Actinosynnemataceae	100,00%	Lechevalieria	96,00%
N-	N-P1N+05	334	Bacteria	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospira	100,00%	Nitrospirales	100,00%	Nitrospiraceae	100,00%	Nitrospira	100,00%
N-	N-P1T1A06	317	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Micrococcaceae	100,00%	Sinomonas	100,00%
N-	N-P1T1B10	372	Bacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinobacteria	100,00%	Actinomycetales	100,00%	Actinosynnemataceae	100,00%	Lechevalieria	93,00%
N-	N-P1T1F08	501	Bacteria	100,00%	Firmicutes	100,00%	Bacilli	100,00%	Bacillales	100,00%	Paenibacillaceae	100,00%	Cohnella	100,00%

\*Classificação feita através do programa CLASSIFIER, versão 2.2 (*training set 6*) em julho de 2010; inclui somente sequências com comprimento  $\geq 250$  pb; valor limite de confiança (*bootstrap*) de 80%; Bibl., biblioteca – C = CONTROLE, N+ = FERT e N- = NAOFERT ; Comp., comprimento da sequência em pb.